

Aus der Klinik für Neurologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. W.-H. Oertel
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg/Lahn
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Wirkmechanismen des MAP-Kinase Inhibitors CNI-1493
auf mikrogliale BV-2 Zellen und primäre Mikroglia**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

David Mengel

aus Marburg



Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps – Universität Marburg am 11.06.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Richard Dodel

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Schütz

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Demenz vom Alzheimertyp	1
1.2 Klinik der Demenz vom Alzheimertyp	1
1.3 Histopathologie der Demenz vom Alzheimertyp	4
1.4 APP-Prozessierung	5
1.5 Oligomerisation von β -Amyloid und Wirkung der Oligomere	9
1.6 Microglia	12
1.7 Inflammation im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp	14
1.8 Funktion der p38 MAPK im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp	17
1.9 CNI-1493	19
1.10 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Verwendete Geräte	22
2.1.2 Verwendete Materialien	23
2.1.3 Verwendete Antikörper	26
2.1.4 Verwendete Kits	27
2.2 Übersicht über häufig verwendete Puffer	27
2.3 Methoden	29
2.3.1 Zellkultur	29
2.3.1.1 Zellkulturmedien und Zellarten	29
2.3.1.2 Materialien für die Zellkultur	29
2.3.2 Kultivierung von Zellen	30
2.3.2.1 Handhabung der Zellen	30
2.3.2.2 Passagieren von Zellen	31

Inhaltsverzeichnis

2.3.2.3 Einfrieren von Zellen	31
2.3.2.4 Auftauen von Zellen	31
2.3.3 Isolation primärer Mikroglia	32
2.3.4 Behandlung von Zellen	33
2.3.5 Präparation von β -Amyloid-Oligomeren	33
2.3.6 CNI-1493 Präparation	34
2.3.7 MTT-assay	34
2.3.8 Proteinextraktion	35
2.3.8.1 RIPA-Puffer und Extraktion	35
2.3.8.2 M-Per Buffer und Extraktion	36
2.3.8.3 Puffer zur Isolation von Sekretasen	37
2.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.3.9.1 Nanodrop	37
2.3.9.2 Die BCA-Methode	38
2.3.10 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.11 Immunoblot	40
2.3.12 Memcode	40
2.3.13 Inkubation mit Antikörpern	41
2.3.14 Dot-Blot	42
2.3.15 Enzymatische Methoden	43
2.3.15.1 α -, β -, γ - Sekretasen Assays	43
2.3.15.2 ELISA	45
2.3.16 FACS-Analyse zur Untersuchung von Phagozytose durch Mikroglia	46
2.3.17 Aufbereitung von RNA / cDNA und Real-Time PCR	49
2.3.17.1 Polymerase chain reaction (PCR) und Real-Time PCR	49
2.3.17.2 RNA Extraktion aus BV-2 Zellen	50

Inhaltsverzeichnis

2.3.17.3 Umschreiben der mRNA in cDNA mithilfe der Reverse Transkriptase	
Polymerase	50
2.3.17.4 Durchführung der Real-Time PCR	51
2.4 Statistische Auswertung	52
3. Ergebnisse	53
3.1 Reduktion von β -Amyloid-Oligomeren durch CNI-1493	53
3.1.1 Der Einfluss von CNI-1493 auf die de novo Entstehung von A β Oligomeren	53
3.1.2 CNI-1493 reduziert Oligomere des β -Amyloid-Proteins im Dot Blot Verfahren	55
3.2 β -Amyloid-Oligomere führen zur Schädigung von mikroglialen Zellen	57
3.3 CNI-1493 verhindert den Zelltod von mikroglialen Zellen	60
3.3.1 CNI-1493 reduziert den β -Amyloid-induzierten Zelltod von mikroglialen Zellen	60
3.3.2 CNI-1493 verhindert nicht die Staurosporin-induzierte Apoptose	62
3.4 CNI-1493 verhindert die Sekretion von β -Amyloid-induzierten Zytokinen durch Mikroglia	63
3.4.1 Die β -Amyloid-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch mikrogliale BV-2 Zellen lässt sich durch CNI-1493 reduzieren	63
3.4.2 Die β -Amyloid-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch primäre Mikroglia lässt sich durch CNI-1493 reduzieren	65
3.4.3 CNI-1493 reduziert die β -Amyloid-induzierte Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges	67
3.4.4 CNI-1493 reduziert die LPS-induzierte IL-6-Sekretion mikroglialer Zellen	68
3.5 CNI-1493 induziert die Aufnahme von β -Amyloid in Mikroglia	68
3.5.1 CNI-1493 erhöht die Aufnahme von β -Amyloid in mikrogliale BV-2 Zellen	69
3.5.2 CNI-1493 erhöht die Aufnahme von β -Amyloid in primäre mikrogliale Zellen	71
3.6 Der Einfluss von CNI-1493 auf Sekretasen der APP-Prozessierung	74
3.6.1 CNI-1493 induziert die α -Sekretase	74
3.6.2 CNI-1493 induziert die Prozessierung des C83 Fragments in mikroglialen Zellen.	75

Inhaltsverzeichnis

3.6.3 CNI-1493 induziert ADAM 9 mRNA in der RT-PCR	77
3.6.4 CNI-1493 vermindert die Sekretion von β -Amyloid durch mikrogliale Zellen	79
4. Diskussion	80
5.1 Zusammenfassung	93
5.2 Abstract	95
6. Literaturverzeichnis	96
7. Anhang	112
7.1 Abkürzungsverzeichnis	112
7.2 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen	116
7.3 Liste der akademischen Lehrer	117
7.4 Danksagung	118

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie der Demenz vom Alzheimertyp

Über 26 Millionen Menschen leiden heute weltweit an der Demenz vom Alzheimertyp (AD) (Brookmeyer et al. 2007). Dabei ist die Tendenz steigend, nicht zuletzt aufgrund der prognostizierten demographischen Entwicklung, die zu einem höheren Anteil älterer Menschen an der Gesamtbevölkerung führen wird. Liegt die Prävalenz der Erkrankung zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr bei rund 3 %, so steigt sie bei den über 85-jährigen über 30 % an (Rice et al. 2001). Damit stellt das Alter den wichtigsten Risikofaktor für die Entwicklung der Erkrankung dar. In Deutschland erkranken jährlich über 120.000 Menschen neu an AD. Da derzeit kein kausaler Therapieansatz verfügbar ist, könnte die Anzahl der Erkrankten weltweit von 35,6 Millionen Erkrankten im Jahr 2010 auf über 65 Millionen Erkrankten im Jahr 2030 ansteigen. Bedenkt man den erheblichen Pflegeaufwand von Demenzkranken, wird AD dadurch eine enorme gesundheitspolitische und sozio-ökonomische Herausforderung darstellen (Wimo und Prince 2010). Neben Interventionen zur Prävention der Erkrankungen könnten insbesondere Strategien, die ein Fortschreiten der Erkrankung verhindern, helfen, die zu erwartenden zukünftigen Belastungen effektiv zu reduzieren (Mesterton et al. 2010).

1.2 Klinik der Demenz vom Alzheimertyp

Im Jahre 1906 beschrieb der Psychiater und Neuropathologe Alois Alzheimer (1864-1915) zum ersten Mal die „eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ seiner Patientin Auguste Deter (Alzheimer 1907).

Im Alter von 51 Jahren hatten sich bei der Patientin in nur wenigen Monaten auffällige Veränderungen in ihrer Persönlichkeit entwickelt. Sie wurde ihrem Ehemann gegenüber zunehmend eifersüchtig, zeigte einen progressiven Gedächtnisverlust sowie starke psychosoziale Defizite. Schließlich war sie zur Bewältigung alltäglicher Aufgaben nicht mehr imstande. Bei Aufnahme in die Klinik fand Alois Alzheimer eine Patientin vor, die weder zeitlich noch örtlich orientiert war und mit der eine strukturierte Konversation nahezu unmöglich schien. In den folgenden Monaten verschlechterte sich auch die Sprachfunktion der Patientin soweit, dass sie kaum noch zu verstehen war.

Sie litt an schwerer Paranoia und misstraute sowohl dem Pflegepersonal als auch ihren betreuenden Ärzten. Innerhalb der nächsten Jahre nahmen die geistigen Fähigkeiten der Patientin zusehends ab, bis sie schließlich vollkommen apathisch wurde und wenige Jahre später verstarb (Cipriani et al. 2010).

In der Schilderung des Patientenschicksals von Auguste Deter hat Alois Alzheimer damit die wesentlichen Symptome beschreiben, die auch heute Kriterien zur Feststellung der Erkrankung bilden (Maurer et al. 1997). Zur Diagnose einer Demenz wird heute in der Regel der Kriterienkatalog nach ICD 10 (International Classification of Diseases) verwendet, der die Erfüllung der folgenden vier Kriterien voraussetzt:

Kriterium A: Multiple kognitive Defizite, die sowohl 1. als auch 2. betreffen:

1. Beeinträchtigung des Gedächtnisses
2. Mindestens eines der folgenden Störungsbilder:
 - Aphasie
 - Apraxie
 - Agnosie
 - Beeinträchtigung exekutiver Funktionen

Kriterium B: Die kognitiven Defizite aus A verursachen in bedeutsamer Weise Beeinträchtigungen im beruflichen und sozialen Funktionsbereichen

Kriterium C: Die Defizite treten nicht ausschließlich im Rahmen eines Delirs auf

Kriterium D: Andere Erkrankungen wie z.B. eine Depression müssen ausgeschlossen sein

Eine Abgrenzung der Demenz vom Alzheimer-Typ zu anderen Erkrankungsbildern, die ebenfalls mit der Entwicklung einer Demenz einhergehen, wird durch die folgenden Faktoren erreicht:

- Nachweis der Demenz in einer klinischen Untersuchung unter der Einbeziehung neuropsychologischer Testverfahren
- Defizite in mindestens zwei kognitiven Bereichen
- Keine Bewusstseinsstörung
- Beginn zwischen dem 40. und 90. Lebensjahr (meist nach dem 65. Lebensjahr)

- Kein Hinweis für andere ursächliche System- oder Hirnerkrankungen

Zusätzlich kann die Bildgebung eine – im Verlauf zunehmende – für die Erkrankung typische zunehmende Hirnatrophie zeigen (Dubois et al. 2007). Es wird ersichtlich, dass die Diagnose der Demenz vom Alzheimertyp vorwiegend klinisch gestellt wird und zeitaufwendig ist.

Unter dem Eindruck neuer diagnostischer Methoden wird in den letzten Jahren vermehrt eine Anpassung der diagnostischen Kriterien angestrebt, die diesen Rechnung trägt. Dies soll insbesondere dazu beitragen, auch Patienten zu erfassen, die klinisch noch nicht das Vollbild einer Demenz haben, jedoch ein hohes Risiko besitzen, dass die beobachteten kognitiven Defizite in eine Demenz von Alzheimertyp übergehen können. Dies erscheint umso wichtiger als insbesondere diese Patientenpopulation erheblich von therapeutischen Interventionen profitieren könnte. Wichtige Kriterien in der Diagnosefindung bilden hierbei die Liquordiagnostik, die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) sowie Positronen-Emission-Tomographie (PET)-Untersuchungen (Dubois et al. 2010). Neue Kriterien der Definition einer Demenz vom Alzheimertyp – welche sich insbesondere für die klinische Forschung konsolidieren - verlangen neben dem Vorliegen typischer mnestischer Defizite auch pathologische Veränderungen von Biomarkern, wie Amyloid- β , τ , und phospho- τ im Liquor cerebrospinalis, pathologische PET-Untersuchungen mit Amyloid-Tracern, mediale temporale Atrophie in der MRT-Untersuchung oder temporo-parietaler Hypometabolismus in der Fluorodesoxyglukose PET-Untersuchung. Darüber hinaus wird vorgeschlagen bei pathologischen Biomarker-Befunden und kognitiven Defiziten, die jedoch noch nicht das Vollbild einer Demenz erreichen, prodromale Demenzen vom Alzheimertyp abzugrenzen. Sind lediglich die Biomarker auffällig und der Patient weist noch keine neuropsychologischen Defizite auf, wird inzwischen die Definition eines präklinischen Status einer Demenz vom Alzheimertyp zur Diskussion gestellt. Leichte kognitive Defizite, die noch nicht genauer eingeordnet werden können und die Aktivitäten des alltäglichen Lebens nicht beeinträchtigen, werden unter der „Mild cognitive impairment (MCI)“ subsumiert (Dubois et al. 2010). Insgesamt ist die klinische Diagnosefindung bei der Demenz vom Alzheimertyp aktuell einem starken Wandel unterworfen, der einerseits den aktuellen Forschungsergebnissen hinsichtlich der Pathogenese Rechnung trägt und andererseits eine frühere Diagnosefindung möglich macht. Diese Diskussion ist derzeit jedoch noch nicht ab-

geschlossen, vielmehr werden wohl auch weitere Forschungsergebnisse Einzug in die klinische Diagnostik finden.

Leider noch sehr enttäuschend sind die sehr eingeschränkten Therapieoptionen bei AD. Derzeit sind lediglich therapeutische Interventionen verfügbar, die im Rahmen einer symptomatischen Therapie den Verlauf der Erkrankung mildern können. Sowohl Acetylcholinesteraseinhibitoren also auch der eingesetzte NMDA-Rezeptorantagonist sind in der Lage einen signifikanten, jedoch sehr begrenzten Einfluss auf das Abschneiden der Patientin in neuropsychologischen Tests zu bewirken. Klinisch bewirken diese Medikamente eine Verzögerung des natürlichen Verlaufs um ca. 6 - 12 Monate. Jedoch kann keines der bisher verfügbaren Mittel die Krankheit ursächlich beeinflussen (Birks 2006, Herrmann et al. 2011). Auch auf die Mortalität der Demenz vom Alzheimertyp haben die derzeit eingesetzten Therapeutika keinen signifikanten Einfluss (Suh et al. 2011).

1.3 Histopathologie der Demenz vom Alzheimertyp

Der bereits beschriebene Verlust mnestischer und weiterer höherer kognitiver Funktionen lässt sich durch den progressiven Befall hippokampaler sowie neokortikaler Hirnregionen durch das Fortschreiten der Erkrankung erklären. Nach Braak und Braak beginnt die Pathologie der Erkrankung in limbischen Arealen des zerebralen Cortex, schreitet dann unter Einbeziehung des Hippocampus fort und breitet sich schließlich über weite Teile des Neokortex und eine Reihe subkortikaler Kerne aus (Braak und Braak 1995).

Das neuropathologische Korrelat der Erkrankung bilden extrazelluläre senile Amyloidplaques und intrazelluläre neurofibrilläre Tangles (Perl 2010). Die neurofibrillären Tangles stellen fibröse Einschlüsse in den Perikarya pyramidaler Neuronen dar. Sie bestehen vornehmlich aus dem Mikrotubuli-assoziierten Tau-Protein. Während dieses Protein eigentlich eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung des Zytoskeletts wahrnimmt, liegt es bei der Demenz vom Alzheimertyp in einer hyperphosphorylierten und somit degenerierten Aggregationsform vor (Lee et al. 1991). Die senilen Plaques enthalten akkumulierte β -Amyloid-Proteine. Durch die Aggregation zu unlöslichen fibrillären Strukturen liegen sie in einer β -Faltblatt-Konfiguration vor. Direkt um die Plaques herum lassen sich zahlreiche dystrophe Neuriten in Form geschädigter neuronaler Axone oder Dendriten nachweisen (Wisniewski et al. 1982).

In der Peripherie finden sich regelmäßig Astrozyten und aktivierte mikrogliale Zellen, die auf die neuroinflammatorische Beteiligung an der Pathologie der Erkrankung hindeuten (Eikelenboom et al. 2011). Zusätzlich zu der Akkumulation in neuritischen Plaques akkumuliert β -Amyloid im Rahmen der Demenz vom Alzheimerstyp auch in kortikalen Blutgefäßen, was zur kongophilen Angiopathie führt. Ein weiteres wichtiges histopathologisches Kriterium stellt der beachtliche Verlust an funktionsfähigen neuronalen Synapsen dar. Masliah et al. konnten zeigen, dass es im Rahmen der Pathologie zu einer enormen Degeneration präsynaptischer Boutons kommt und dass dieser Untergang synaptischer Strukturen ein wichtiges pathomorphologisches Korrelat des kognitiven Abbaus der erkrankten Patienten darstellt (Masliah und Terry 1993).

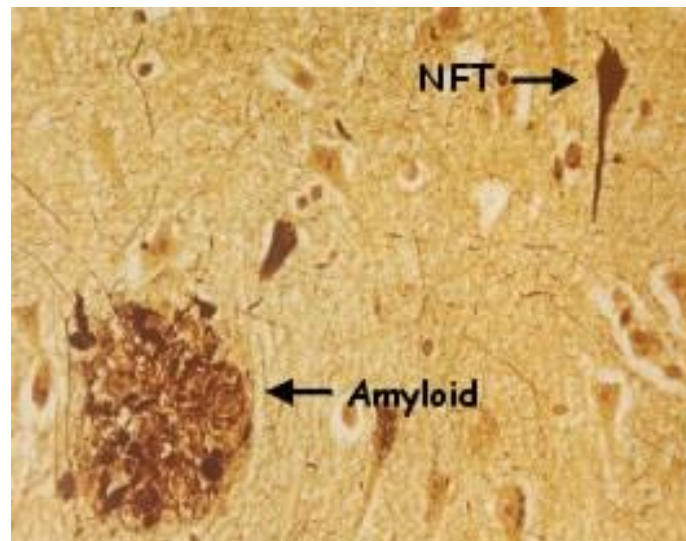


Abbildung 1: Histopathologische Charakteristika der Demenz vom Alzheimerstyp. Die histologische Aufbereitung des Gehirns eines an der Demenz vom Alzheimerstyp Erkrankten zeigt extrazelluläre Amyloid-Plaques und intrazelluläre neurofibrilläre Tangles (NFT). (Bildquelle: Experimental Genetics Group, Katholieke Universiteit Leuven 2009, med.kuleuven.be/legtegg/AD.html).

1.4 APP-Prozessierung

Nachdem senile Plaques bereits 1907 von Alois Alzheimer beschrieben worden waren, gelang es erst in den 1980er Jahren, das Protein nachzuweisen, dessen Aggregation zur Bildung derselben führt. Masters et al. konnten als erste das β -Amyloid-Peptid aus den Plaques verstorbener Patienten isolieren und weiter charakterisieren (Masters et al. 1985).

Kang et al. konnten wenig später zeigen, dass das Amyloid Precursor Protein (APP) (Giuffrida et al. 2010), aus dem das β -Amyloid durch enzymatische Spaltung geschnitten wird, auf dem Chromosom 21 liegt (Kang et al. 1987). Da sich auch in den Cortices von Patienten, die an einer Trisomie 21 leiden, die für die Demenz von Alzheimer typischen Plaques und Tangles nachweisen lassen, folgerten die Autoren daraus die Hypothese, dass eine Überproduktion von β -Amyloid den Ausgangspunkt der Erkrankung darstelle. In den folgenden Jahren konnten eine ganze Reihe von Mutationen im APP-Gen gefunden werden, die in den betroffenen Familien zu einer vererbaren Form der Demenz vom Alzheimer typ (Walsh et al. 2002) mit Krankheitsmanifestation bereits in jungen Jahren führte. (Goate et al. 1991, Mullan et al. 1992). Zusätzlich konnten in einigen Familien auch Mutationen in den Enzymen gefunden werden, die an der Produktion von β -Amyloid aus APP beteiligt sind. Aus diesen Überlegungen entstand die Amyloid-Kaskaden-Hypothese, die eine erhöhte Konzentration von β -Amyloid als Ursache und Beginn der Pathologie beschreibt (Hardy und Higgins 1992). Weitere Bestätigung fand diese Hypothese durch die Entwicklung von Mausmodellen der Demenz vom Alzheimer typ. Durch die Klonierung von humanem APP und Enzymen der APP-Prozessierung von Patienten mit familiärer Demenz vom Alzheimer typ und die Expression dieser Gene in Mäusen, konnte die Pathologie der Demenz in Mäusen zumindest teilweise induziert werden (Duyckaerts et al. 2008).

β -Amyloid wird aus APP, durch intramembranöse Enzyme, den sogenannten Sekretasen, abgespalten (s. Abbildung 2). Diesen Vorgang nennt man regulierte intramembranöse Proteolyse (RIP). Die RIP von APP kann von einer Reihe von Zellen im ZNS wahrgenommen werden. Neben Neuronen sind insbesondere auch Astrozyten sowie Mikroglia an der Proteolyse von APP beteiligt. Die Prozessierung von APP kann entweder durch die α -Sekretasen oder die β -Sekretase, die auch β -site APP-cleaving enzyme (BACE) genannt wird (Haass und Selkoe 2007), erfolgen. Im Rahmen des amyloidogenen Weges der APP-Prozessierung wird APP aus der Zellmembran in Endosomen aufgenommen und durch die β -Sekretase in ein lösliches β -APP Fragment ($sAPP\beta$) und das membranständige C-terminale β -Fragment (β -CTF) gespalten, welches anschließend durch die Einwirkung des γ -Sekretasen-Komplexes weiter prozessiert wird. Der γ -Sekretasen-Komplex schneidet innerhalb der β -CTF Sequenz, wodurch es zur Bildung von β -Amyloid kommt. Dabei kann die γ -Sekretase an verschiedenen Stellen schneiden, wodurch es zur Freisetzung von β -Amyloid Sequenzen unterschiedlicher Länge kommt (Wolfe et al. 1999).

Von besonderer Relevanz ist hier, ob die γ -Sekretase die Bildung von β -Amyloid₁₋₄₀ oder β -Amyloid₁₋₄₂ katalysiert, da β -Amyloid mit 42 Aminosäuren *in vivo* eine weitaus stärkere Tendenz zur Oligomerisation und somit zur Bildung toxischer β -Amyloid Spezies aufweist. Der bei der β -Amyloid Abspaltung intrazellulär verbleibende Anteil des β -CTF wird intrazelluläre APP Domäne (AICD) genannt. Seine Funktion ist bisher noch nicht abschließend geklärt (Sastre et al. 2001). Ein Großteil des β -Amyloid sowie der n-terminalen Fragmente, wie den sAPP β , wird sezerniert. Eine Möglichkeit, in die pathologische Kaskade der Demenz vom Alzheimerstyp einzugreifen, besteht darin, die Aktivität der β -Sekretase zu reduzieren, um so die Bildung von β -Amyloid zu reduzieren. Darüber hinaus lässt sich durch eine Modulation der γ -Sekretaseaktivität die Entstehung von β -Amyloid unterbinden. Trotz intensiver Anstrengungen hat es sich jedoch bisher als äußerst schwierig herausgestellt, sichere und selektive β - und γ - Sekretaseinhibitoren zu entwickeln (Imbimbo und Giardina 2011). So musste beispielsweise eine Phase III Studie des γ -Sekretaseinhibitors Semagacestat Im Jahre 2010 vorzeitig abgebrochen werden, da sich in der Behandlungsgruppe ein vermehrter Abbau kognitiver Fähigkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe abzeichnete. Ein Grund hierfür könnte der Einfluss der Inhibitoren auf eine Vielzahl bedeutender physiologischer Substrate der beiden Sekretasen darstellen.

Die Proteolyse von APP durch die α -Sekretase hingegen führt nicht zur Bildung von β -Amyloid. Dieser Prozess wird daher als der nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung bezeichnet, da die α -Sekretase innerhalb der β -Amyloid Sequenz von APP schneidet und somit die Freisetzung von β -Amyloid durch die Einwirkung der γ -Sekretase unterbindet. Im Unterschied zur β -Sekretase ist die α -Sekretase direkt an der Zelloberfläche lokalisiert, wodurch APP vor der Prozessierung nicht erst in Endosomen aufgenommen werden muss. Durch die Wirkung der α -Sekretase wird APP in ein lösliches α -APP Fragment (sAPP α) und das membranständige C-terminale α -Fragment (CTF- α) gespalten. Auch bei diesem Wege der APP-Spaltung kommt es zur weiteren Proteolyse des C-terminalen Fragmentes durch die sequentielle Einwirkung des γ -Sekretasen-Komplexes, nachdem das CTF- α Peptid in Endosomen internalisiert wurde. Es entsteht ebenfalls ein intrazelluläres Fragment (AICD) sowie p3, welches einem verkürzten β -Amyloid Fragment entspricht, sich von diesem aber deutlich unterscheidet (Haass und Selkoe 1993).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass zwischen der α - und β -Sekretase eine gegenseitige Konkurrenz um das Substrat APP besteht (Hung et al. 1993). Eine Möglichkeit,

die Produktion des toxischen β -Amyloid Proteins zu reduzieren, liegt damit in der Induktion der α -Sekretasenaktivität in Zellen des zentralen Nervensystems.

Postina et al. konnten in einem Mausmodell der Demenz vom Alzheimerstyp nachweisen, dass die Überexpression eines Enzyms mit α -Sekretasenfunktion durch Substratkonkurrenz zu einer reduzierten Prozessierung von APP durch die β -Sekretase führt (Postina et al. 2004). Dadurch konnte in der Folge auch die Akkumulation von β -Amyloid im Gehirn der Tiere effektiv unterbunden werden. Die Autoren der Studie konnten zudem eine erhöhte Konzentration des sAPP α -Proteins im Liquor und Gehirn der Mäuse detektieren, welches neuroprotektive und wachstumsfördernde Eigenschaften aufweist (Ring et al. 2007). Während die herausragende Funktion der α -Sekretase in Prozessen der Embryogenese bekannt ist (Hattori et al. 2000) und auch die α -Sekretase über das APP hinaus weitere physiologische Substrate besitzt, konnten im Rahmen einer Modulation der Sekretasenaktivität im adulten Mausgehirn bisher keine negativen Auswirkungen nachgewiesen werden (Prinzen et al. 2009).

Die Funktion der α -Sekretase kann von einer ganzen Reihe von Membran-gebundenen Proteasen wahrgenommen werden, die der Gruppe der „a disintegrin and metalloprotease“ Familie (ADAM) angehören. Diese Gruppe von Enzymen ist in Wirbeltieren an zahlreichen zellbiologischen Vorgängen wie der Zelldifferenzierung oder bei der Initiation von Entzündungsreaktionen beteiligt (van Goor et al. 2009). Von besonderer Bedeutung für die Prozessierung von APP sind die Enzyme ADAM9, ADAM 10 sowie ADAM17, deren Funktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Kojro und Fahrenholz 2005).

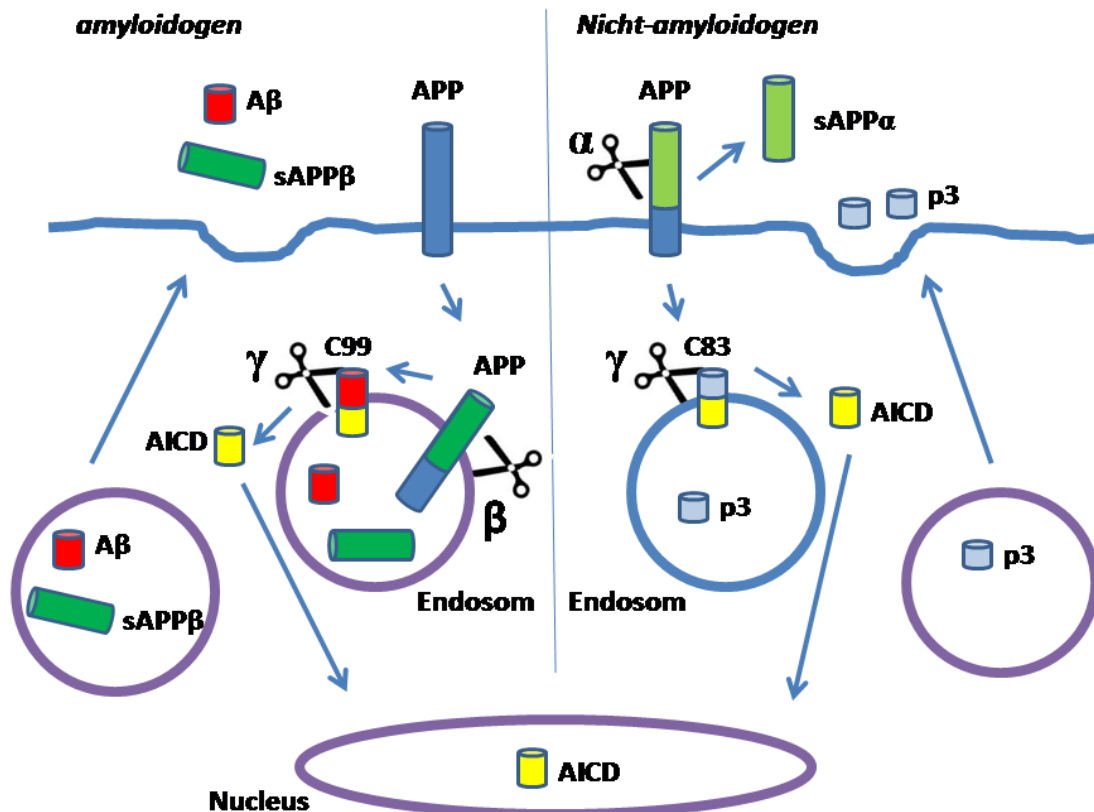


Abbildung 2: Prozessierung von APP durch Sekretasen (nach Aguzzi und O'Connor 2010). APP wird durch die sequentielle Spaltung durch Sekretasen prozessiert. Im Rahmen des amyloidogenen Weges wird APP in Endosomen aufgenommen und durch die β -Sekretase in sAPP β sowie das C99 Fragment gespalten. C99 wird im Endosom durch intramembranöse Prozessierung der γ -Sekretase in β -Amyloid und den intrazellulären APP Bereich (AICD) aufgetrennt. β -Amyloid und sAPP β können anschließend von der Zelle sezerniert werden.

Der nicht-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung beginnt mit der Spaltung von APP an der Zelloberfläche durch die α -Sekretase. Das entstehende C83 Fragment wird in Endosomen aufgenommen und durch die γ -Sekretase in das lösliche p3 Fragment und AICD aufgetrennt. Auch das p3 Fragment kann durch die Zelle sezerniert werden. AICD kann in den Zellkern aufgenommen werden und ist an der Regulation der Genexpression beteiligt.

1.5 Oligomerisation von β -Amyloid und Wirkung der Oligomere

Nachdem bereits Alois Alzheimer fibrilläre Ablagerungen des β -Amyloid wie die senilen Plaques als histopathologisches Merkmal der Erkrankung beschrieben hatte, haben in der Vergangenheit eine Reihe von Arbeitsgruppen versucht, postmortal das Ausmaß der Ab-

lagerungen mit den kognitiven Defiziten der Patienten zu korrelieren. Dies gelang jedoch nur sehr eingeschränkt. Viel besser ließ sich dagegen der Gehalt an löslichen β -Amyloid Spezies wie den Oligomeren mit Auftreten und Ausmaß der kognitiven Störungen in Beziehung setzen (Lue et al. 1999). Auch *in vitro* Untersuchungen und Experimente mit Mausmodellen der Demenz vom Alzheimertyp konnten zeigen, dass Oligomere des β -Amyloid Proteins essentiell für die Initiation der pathologischen Veränderungen im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp sind. β -Amyloid aggregiert unter physiologischen Bedingungen sehr leicht zu oligomeren Strukturen, die sich anschließend zu fibrillären Amyloid zusammenlagern können, wobei es zur Bildung von β -Faltblattstrukturen kommt. Dabei ist die Tendenz zur Oligomerisation von β -Amyloid₁₋₄₂ stärker ausgeprägt als die von β -Amyloid₁₋₄₀ (LeVine 2007). Liegt β -Amyloid hingegen in seiner monomeren Form, besitzt es kaum toxisches Potential. Giuffrida et al. konnten sogar zeigen, dass monomeres β -Amyloid in sehr geringen Konzentrationen neuroprotektiv wirksam ist (Giuffrida et al. 2010). Während man zunächst davon ausging, dass Fibrillen des β -Amyloid und insbesondere die Plaques β -Amyloid für die toxischen Effekte verantwortlich sind, werden heute lösliche Oligomere des Proteins als die toxische Spezies angesehen, die zur Initiation der Amyloid-Kaskade führen (Selkoe 2008). Neben einer Blockade der β -Amyloid Produktion durch Modulation der Sekretasenfunktion ist daher auch die Oligomerisation des Peptids ein möglicher Angriffspunkt zur Behandlung der Erkrankung. Im Mittelpunkt des Interesses stehen hier Substanzen, die die Oligomerisation von β -Amyloid unterbinden sowie Pharmaka, die in der Lage sind, bestehende Oligomere in nicht toxische Monomere aufzubrechen (Hardy und Selkoe 2002).

Durch die Wirkung der Oligomere können eine Reihe unterschiedlicher Effekte ausgelöst werden. β -Amyloid-Oligomere sind in der Lage, die synaptische Übertragung neuronaler Verschaltungen zu beeinträchtigen und auch Neurone direkt zu schädigen (Walsh et al. 2002). Auch mikrogliale Zellen, die einen wichtigen Beitrag zur Homöostase im Gehirn und somit zur Aufrechterhaltung neuronaler Netzwerke leisten, können durch die Einwirkung von Oligomeren des β -Amyloid Proteins Schaden nehmen (Davenport et al. 2010). Auf welchem Wege sie auf molekularer Ebene schädigend wirken, ist derzeit nicht abschließend geklärt. Für die toxischen Effekte werden unter anderem porenbildende Eigenschaften des Amyloid (Chang et al. 2011) sowie Wirkungen auf den Kalziumhaushalt der Zellen verantwortlich gemacht (Malchiodi-Albedi et al. 2011).

Zudem konnte die Bindung von β -Amyloid an zahlreiche Rezeptoren der Zellmembran, wie NMDA (N-methyl-D-aspartate) oder AMPA (α -amino-hydroxy-methyl-isoxazole) oder nikotinergen Rezeptoren, nachgewiesen werden (Haass und Selkoe 2007).

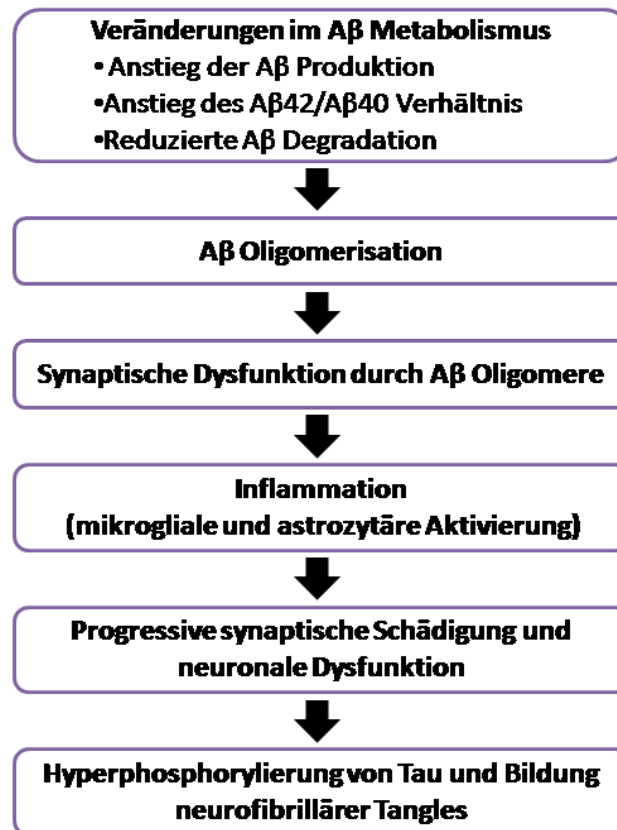


Abbildung 3: Die Amyloid-Kaskadenhypothese (modifiziert nach Haass und Selkoe 2007): Veränderungen im β -Amyloid Metabolismus sind der Ausgangspunkt der Amyloid-Kaskadenhypothese. Dadurch kommt es zur Oligomerisation von β -Amyloid, wodurch zunächst subtile, später aber schwere Schäden der synaptischen Plastizität neuronaler Netzwerke entstehen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Fibrillation der Oligomere mit nachfolgender Entwicklung seniler Plaques. β -Amyloid Oligomere und Fibrillen induzieren eine inflammatorische Reaktion von mikroglialen Zellen und Astrozyten. Die entstehende Entzündungsreaktion bedingt eine weitere synaptische Schädigung und bewirkt eine Dysfunktion neuronaler Zellen. Zudem kommt es in der Folge zur Hyperphosphorylierung von Tau und zur Bildung neurofibrillärer Tangles in Neuronen.

1.6 Mikroglia

Mikrogliale Zellen stellen einen Bestandteil des mononukleären Phagozytosesystems oder auch Monozyten-Makrophagen-Systems dar (Streit 2002). Neben der Mikroglia des zentralen Nervensystems gehören diesem auch die Makrophagen, die Kupffer-Stern-Zellen der Leber, die Langerhanszellen der Haut sowie des Osteo- und Chondroklasten von Knochen und Knorpel an. Gemeinsam sind diesen Zellen bei allen Unterschieden die Fähigkeit der Phagozytose von Fremdmaterial und Krankheitserregern sowie die Antigenpräsentation des prozessierten Materials. Hier sei jedoch nebenbei bemerkt, dass Osteo- und Chondroklasten vornehmlich körpereigenes Material phagozytieren. Über einen langen Zeitraum bestand Unklarheit über die Herkunft der Mikroglia. Heute weiß man, dass sie myeloischen Ursprungs sind und nicht dem neuroektodermalen Gewebe entstammen (McKercher et al. 1996). Sie repräsentieren ca. 5-20 % der Gliazellpopulation des ZNS und finden sich ubiquitär verteilt (Lawson et al. 1990). Ein entscheidendes Merkmal der Mikroglia stellt die Plastizität ihres Aktivierungsstatus dar. Unterschieden wird zunächst zwischen „ruhender“ Mikroglia und dem aktivierten Status beim Vorliegen pathologischer Stimuli. Wie im Folgenden besprochen wird, ist diese Einteilung jedoch sehr vereinfachend und bedarf einer Differenzierung. Nicht zuletzt, wenn man die Funktion mikroglialer Zellen im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen besser verstehen möchte, bzw. in den Aktivierungsstatus dieser Zellen therapeutisch eingreifen möchte.

Bis vor wenigen Jahren dominierten die Begriffe „residente Makrophagen“ oder „ruhende Mikroglia“ ganz entscheidend die Vorstellung über das Erscheinungsbild und die Funktion der mikroglialen Zellen im nicht-aktivierten Zustand. Diese Bezeichnungen werden heute von vielen Autoren zunehmend in Frage gestellt. Besonders im Rahmen von in vivo Studien, beispielsweise mit Hilfe der konfokalen Two-photon Laser Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass auch nicht-aktivierte mikrogliale Zellen ein enormes Migrationspotential besitzen und einen wichtigen Beitrag zur Homöostase im zentralen Nervensystem liefern (Raivich 2005). Im Rahmen dieser Funktion bilden mikrogliale Zellen ständig neue Ausstülpungen ihrer Zelloberfläche aus und untersuchen und überwachen ihre direkte Umgebung (Davalos et al. 2005, Nimmerjahn et al. 2005). Betrachtet man die verschiedenen mikroglialen Populationen im zentralen Nervensystem so stellt man fest, dass abhängig von der regionalen Verteilung Unterschiede in ihrer Morphologie und Zytoarchitektur beobachtet

werden können (Lawson et al. 1990, de Haas et al. 2008). Ruhende mikrogliale Zellen stellen somit in keinster Weise eine einheitliche Population dar, sondern scheinen in ihrer Mikroumgebung spezifische Funktionen und Aufgaben wahrzunehmen (Hanisch und Kettenmann 2007). Interessanterweise scheinen Mikroglia dabei auch an der Ausbildung neuronaler Netzwerke im Rahme der postnatalen Reifung des Gehirns sowie an der Knüpfung und Aufrechterhaltung neuronaler Verschaltungen und Netzwerke im Rahmen von Lernprozessen beteiligt zu sein (Tremblay et al. 2011).

Pathogene Stimuli führen zur Aktivierung mikroglialer Zellen. Während man lange Zeit angenommen hatte, dass jegliche Aktivierung mikroglialer Zellen zu einem uniformen reaktiven Aktivierungstyp mikroglialer Zellen führt, weiß man heute, dass Mikroglia spezifisch auf verschiedene Stimuli antworten können (Stoll und Jander 1999). Um eine grobe Annäherung an die verschiedenen Aktivierungsstadien mikroglialer Zellen zu gewinnen, kann zunächst das klassische Konzept der Aktivierung von Makrophagen herangezogen werden. Im Weiteren müssen dann noch einige spezifische Eigenschaften mikroglialer Zellen beachtet werden, um die mikrogliale Aktivierung genauer beschreiben zu können (Ransohoff und Perry 2009). Makrophagen können einerseits durch fremde „nicht selbst“ Pathogene oder durch beschädigte dem jeweiligen Organismus zugehörige Antigene aktiviert werden. In einem ersten Schritt führt dies zur Initiation von Vorgängen, die dem Abbau des Pathogens beispielsweise durch Phagozytosevorgänge, den Beginn von Heilungsprozessen und der Entwicklung von Resistenz gegenüber dem Pathogen zum Ziel haben (Ransohoff und Perry 2009). In einem zweiten Schritt interagieren Makrophagen mit T-Zellen zur Initiation spezifischer Entzündungsreaktionen. Dabei können verschiedene Reaktionstypen unterschieden werden, die als M1 und M2 Typ bezeichnet werden. Endogen und exogene Toll-like-receptor Liganden in Kombination mit IFN- γ und LP induzieren den klassischen M1-Reaktionstyp, der durch eine robuste Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist. Diese wird von der Ausschüttung von IL-1 β , IL-12, TNF- α sowie NO-Radikalen gefolgt (Cunningham 2012). Dahingegen können IL-4 und IL-13 bzw. die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- β den alternativen Phänotyp M2 induzieren (Martinez et al. 2008). Dadurch kann die Fähigkeit der Zellen zur Endocytose gesteigert werden sowie die Sekretion eines antiinflammatorischen Zytokin- und Prostaglandinprofils eingeleitet werden (Mosser und Edwards 2008). In dieses Konzept müssen jedoch einige zusätzliche Aspekte integriert werden, wenn man die Aktivierung mikroglialer Zellen beschreiben möchte. So sollte berück-

sichtigt werden, dass mikrogliale Zellen im physiologischen Zustand durch die Blut-Hirn-Schranke nicht in Kontakt mit Serumproteinen treten. Im Gegensatz zu peripheren Monozyten limitiert dies deren Erforschung in *in vitro* Zellkultursystemen (Adams et al. 2007), da in diesen Serumproteine in der Regel notwendiger Bestandteil der Zellkulturmedien darstellen. Diese Trennung stellt auch einen Bestandteil der „Immunprivilegiertheit“ mikroglialer Zellen dar. Im Gegensatz zu vielen peripheren Monozyten weisen mikrogliale Zellen einen äußerst inaktiven Phänotyp auf, der vermutlich eine notwendige Konsequenz ihrer direkten Nachbarschaft zu den fragilen Neuronen darstellt (Ransohoff und Perry 2009). Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass mikrogliale Zellen zwar ein Bestandteil des MPS sind, jedoch auch als gliale Zellen des Gehirns betrachtet werden müssen. Sie sind in der Lage auf Neurotransmitter zu antworten und der Gehalt und die Verfügbarkeit von neuronalen Botenstoffen kann ihren Aktivierungsstatus direkt beeinflussen (Kaushal und Schlichter 2008, Taylor et al. 2003). Viele Autoren schreiben heute mikroglialen Zellen sogar eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung und den Abbau neuronaler Plastizität zu. (Fourgeaud und Boulanger 2007, Stevens et al. 2007)

Während eine adäquate Aktivierung mikroglialer Zellen zur Abwehr pathogener Keime als physiologisch anzusehen ist, kann die langandauernde Aktivierung mikroglialer Zellen in nicht-infektiösen ZNS-Erkrankungen, wie dem Schlaganfall oder auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen, schädliche Auswirkungen insbesondere auf Neuronen haben (Block und Hong 2007, Griffiths et al. 2007). Während man daher zunächst auf eine Suppression der mikroglialen Aktivierung zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen abzielte, wurden in den letzten Jahren auch zunehmend die positiven Eigenschaften mikroglialer Zellen herausgehoben, beispielsweise deren Fähigkeit zur Phagozytose toxischen β -Amyloids bei der Demenz vom Alzheimertyp oder α -Synuklein bei Morbus Parkinson. Aktueller Forschungsgegenstand ist daher vielmehr die Modulation mikroglialer Aktivierung als deren reine Herunterregulation (Gomes-Leal 2012).

1.7 Inflammation im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp

Ebenso wie die Ausbildung seniler Plaques und neurofibrillärer Tangles stellt die Neuroinflammation einen charakteristischen Aspekt der Demenz vom Alzheimertyp dar. Sowohl im Gehirn von erkrankten Patienten als auch in transgenen Mausmodellen der Erkrankung

lassen sich aktivierte mikrogliale Zellen sowie Astrozyten nachweisen. Der Hauptanteil mikroglialer Zellen findet sich in direkter Nähe zu den senilen Plaques. Dennoch lassen sich im gesamten Gehirn entzündliche Veränderungen beobachten (Combs 2009). Werden Mikroglia durch oligomere oder fibrilläre β -Amyloid Spezies aktiviert, kommt es durch Bindung von β -Amyloid an Rezeptoren auf der Zellmembran zu einer Induktion spezifischer inflammatorischer Signalwege. Unter diesen nehmen MAPK (mitogen activated protein kinases) wie die p38 MAPK und der p42/44 MAPK Weg eine bedeutende Stellung ein (siehe Kapitel 1.8). Infolge ihrer Aktivierung akkumulieren sie im Karyoplasma, wo sie die Transkription entscheidender Gene der Entzündungsreaktion induzieren (Schieven 2005). Hierdurch reagieren mikrogliale Zellen nach der Stimulation durch β -Amyloid mit der Sekretion verschiedener inflammatorischer Mediatoren. Unter diesen finden sich Zytokine, Chemokine oder auch freie Radikale (Heneka und O'Banion 2007). Dabei kommt den Zytokinen eine entscheidende Rolle zu. Zu den wichtigsten Zytokinen im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp zählen Interleukine und $\text{TNF-}\alpha$, aber auch antiinflammatorische Mediatoren wie Interleukin-10 oder $\text{TGF-}\beta$. In Analogie zu Entzündungsreaktionen außerhalb des ZNS ist diese Aktivierung mikroglialer Zellen zunächst als nützliche Antwort des Organismus auf pathologische Stimuli anzusehen (Heneka et al. 2010). Im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp induziert die Aktivierung mikroglialer Zellen die Aufnahme und Abbau des toxischen β -Amyloid (Bolmont et al. 2008). Auch für die Funktion neuronaler Zellen und der synaptischen Verbindung der Nervenzellen untereinander leisten mikrogliale Zellen einen entscheidenden Beitrag. Streit et al. konnten in der histopathologischen Aufarbeitung von AD-Gehirnen zeigen, dass gerade geschädigte und dystrophe Mikroglia, die nicht mehr in der Lage sind, ihre protektive Funktion gegenüber Neuronen auszuüben, mit der Entstehung der Demenz vom Alzheimertyp in Verbindung zu bringen sind (Streit et al. 2009). Bestätigungen fanden diese Beobachtung in jüngster Zeit in Zellkulturexperimenten (Tremblay et al. 2010, Kawamata und Shimohama 2011).

Tatsächlich können neben Neuronen auch Mikroglia durch die Einwirkung von β -Amyloid Oligomeren geschädigt werden. Davenport et al. konnten nachweisen, dass primäre mikrogliale Zellen durch die Inkubation mit β -Amyloid in Apoptose übergehen können und in der Folge auch Neuronen dadurch geschädigt werden (Davenport et al. 2010).

Eine prolongierte und übersteigerte Aktivierung von Entzündungszellen stellt jedoch die Kehrseite der Inflammation dar. Für viele Zytokine, wie IL-6 oder $\text{TNF-}\alpha$ konnte gezeigt

werden, dass sie einen negativen Effekt auf das Überleben neuronaler Zellen sowie die Integrität neuronaler Netzwerke ausüben können (Tancredi et al. 2000, Combs et al. 2001). Für Interleukin-1 β sowie für TNF- α konnte zudem eine Modulation der Prozessierung von APP nachgewiesen werden. Damit könnten Zytokine auch einen Beitrag zur Induktion einer erhöhten β -Amyloid Produktion leisten (Sastre et al. 2006). Für monozytäre Zellen konnte eine direkte Verbindung zwischen Entzündung und der Produktion von toxischem β -Amyloid gezeigt werden (Sondag und Combs 2010). Durch das inflammatorische Milieu könnte somit die Akkumulation von β -Amyloid im Gehirn weiter gesteigert werden.

Die Schädigung neuronaler Zellen wiederum ist ein potenter Induktor weiterer Inflammation, wodurch in der Folge ein Circulus vitiosus in der Progression der Demenz vom Alzheimer-Typ ausgelöst werden kann.

Wie bereits weiter oben dargestellt, wird als Ergebnis aus zahlreichen Studien immer deutlicher, dass die Aktivierung mikroglialer Zellen jedoch keinen dichotomen Charakter besitzt. Es gibt nicht ausschließlich die Zustände ruhend oder aktiviert. Vielmehr können mikrogliale Zellen in verschiedenen phänotypischen Ausprägungen innerhalb dieser beiden Extreme vorliegen. Zwei besonders gut charakterisierte Funktionsstadien sind die bereits erwähnten M1- und M2-Typen. Die klassische Aktivierung, beispielsweise durch β -Amyloid, führt zur Induktion des M1-Typs. Dieser ist durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und freier Radikale gekennzeichnet. Zudem konnte zumindest für β -Amyloid-Oligomere eine reduzierte Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose gezeigt werden. Der M2-Typ stellt dagegen einen alternativen Aktivierungsweg monozytärer Zellen dar. Er ist Bestandteil einer reduzierten inflammatorischen Reaktion und kann zudem durch eine erhöhte Phagozytose der Zellen charakterisiert sein (Michelucci et al. 2009). Bei der Betrachtung mikroglialer Aktivierungszustände ist zu berücksichtigen, dass im Gehirn nicht von einem uniformen Aktivierungstyp ausgegangen werden kann. Zeitlich können nebeneinander mikrogliale Zellen im M1- oder M2-Typ oder auch nicht aktivierte Mikroglia beobachtet werden. Verschiedene Autoren gehen zudem davon aus, dass der Aktivierungstyp im zeitlichen Verlauf der Demenz vom Alzheimer-Typ Veränderungen unterliegt. Jimenez et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass sich der mikrogliale Phänotyp vom alternativen Typ zu Beginn der Erkrankung zum klassischen Typ in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung verändert (Jimenez et al. 2008). Zu beachten ist weiterhin, dass es im Rahmen der Alzheimer-Pathologie zur Einwanderung peripherer monozytärer Zellen in das ZNS kommen kann,

die sich wiederum hinsichtlich ihrer Aktivierung von den ZNS-residenten mikroglialen Zellen unterscheiden können. Wann und in welchem Umfang periphere Immunzellen in diesem Zusammenhang in das Gehirn immigrieren können, ist derzeit jedoch noch nicht abschließend geklärt (Schwartz und Shechter 2010).

Zwar stellt auch gerade bei der Betrachtung der Demenz vom Alzheimerstyp die funktionelle Polarisierung der Zellen in M1- und M2-Zellen eine Vereinfachung dar, doch sie verdeutlicht die enorme Plastizität der Aktivierung von monozytären Zellen. Betrachtet man die Funktion mikroglialer Zellen in der Zusammenschau, so wird deutlich, dass eine bloße Reduktion auf die mikrogliale Aktivierung zu kurz greifen würde. Ziel einer therapeutischen Intervention im Rahmen der Demenz vom Alzheimerstyp sollte daher die gezielte Modulation ihrer Funktion sein, um die protektiven Elemente ihrer Funktion, wie den Abbau des toxischen β -Amyloid oder die Sekretion neurotropher Mediatoren, therapeutisch zu nutzen. Umso wichtiger ist es in diesem Zusammenhang, die direkte Schädigung von Immunzellen durch β -Amyloid Oligomere zu unterbinden, um eine Dysfunktion oder auch den Untergang der Zellen zu verhindern.

1.8 Funktion der p38 MAPK im Rahmen der Demenz vom Alzheimerstyp

Der Signalweg der p38 Mitogen activated Protein Kinase (MAPK) ist Teil einer Kaskade, von denen es vier wesentliche Mitglieder gibt: ERK1/2, ERK 5, p42/44 und p38. Allen genannten MAPK gemeinsam ist die Phosphorylierung durch Proteinkinasen, die durch die Einwirkung äußerer Stimuli aktiviert wurden (Cuenda und Rousseau 2007). Nach der Phosphorylierung an ihren Tyrosin und Threonin Positionen liegen die MAPK in aktivierter Form vor und können durch die Stimulation weiterer Proteinkinasen oder auch entsprechender Transkriptionsfaktoren die Antwort der Zelle auf die veränderten extrazellulären Gegebenheiten vermitteln.

Für eine Reihe von entzündlichen Erkrankungen, wie den Morbus Crohn oder die chronische Polyarthrit, kommt dabei besonders der p38 MAPK Familie eine entscheidende Bedeutung (Schindler et al. 2007). Auch im Rahmen der inflammatorischen Komponente neuro-degenerativer Erkrankungen wie der Demenz vom Alzheimerstyp oder der Parkinson Krankheit spielt die p38 MAPK eine zentrale Rolle (Munoz und Ammit 2010). Bereits in frühen Stadien

der Demenz vom Alzheimer-Typ lässt sich im menschlichen Gehirn eine starke Aktivierung des p38 MAPK Signalweges nachweisen. Auch in Zellkulturexperimenten konnte eine Schlüsselstellung dieser MAPK in der Initiation und Aufrechterhaltung von Entzündungsreaktion im zentralen Nervensystem bewiesen werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die p38 MAPK eine wichtige Rolle in der Regulation der IL-1 β und TNF- α Sekretion monozytärer Zellen einnimmt (Bhat et al. 1998). Neben der klassischen Aktivierung durch Lipopolysaccharide konnte auch durch β -Amyloid eine erhöhte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch die Aktivierung der p38 MAPK beobachtet werden. Auch in Astrozyten ließ sich durch β -Amyloid auf diesem Wege eine erhöhte NF κ B und iNOS Expression induzieren (Bhat et al. 2002). Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine Beteiligung der p38 MAPK an der reduzierten Fähigkeit mikroglialer Zellen zur Phagozytose von β -Amyloid. Zhu et al. konnten nachweisen, dass eine Aktivierung mikroglialer Zellen durch LPS zu einer erheblich verminderten Aufnahme von β -Amyloid führt. Eine Präinkubation mit einem spezifischen p38 MAPK Inhibitor konnte diesen Effekt wirkungsvoll verhindern (Zhu et al. 2008).

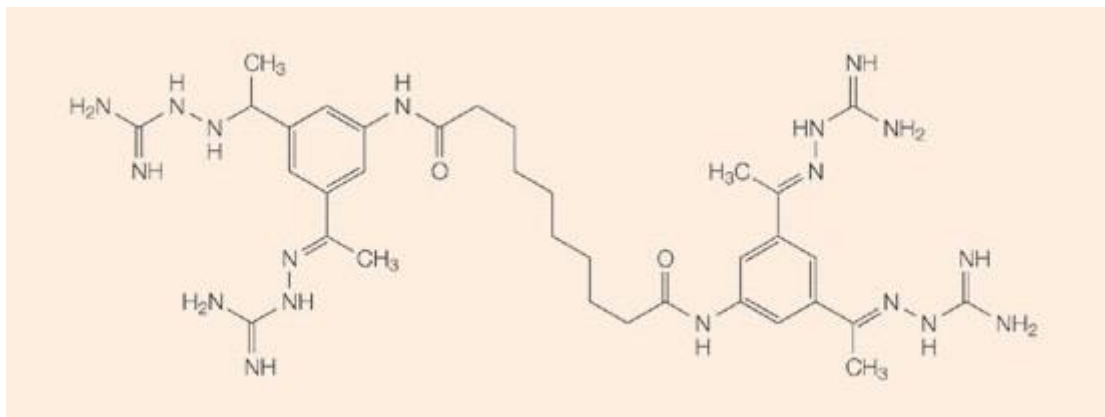
Die Bedeutung der p38 MAPK für die pathologischen Prozesse bei der Demenz vom Alzheimer-Typ ist jedoch nicht ausschließlich auf Entzündungszellen beschränkt. Auch für die Entstehung der intrazellulären Tangles in Neuronen zeigt sich die Kinase verantwortlich. Neben einer Reihe anderer Enzyme konnte eine Mitwirkung der p38 MAPK an der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins nachgewiesen werden. Die p38 MAPK könnte damit neben der Schädigung neuronaler Zellen über die Induktion von Entzündungsmediatoren auch direkt an der Dysfunktion und Apoptose neuronaler Zellen beteiligt sein (Churcher 2006). Darüber hinaus ist auch eine Beteiligung der MAPK an der Reduktion synaptischer Übertragung zwischen Neuronen bekannt. Eine übersteigerte Aktivierung der p38 MAPK könnte damit auch mitverantwortlich für die gestörte synaptische Plastizität neuronaler Netzwerke bei der Alzheimer-Erkrankung sein (Origlia et al. 2008).

Eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention im Rahmen der Demenz vom Alzheimer-Typ wäre daher die Inhibition der p38 MAPK. Obwohl bereits eine Reihe von p38 MAPK Inhibitoren für die Behandlung von entzündlichen Erkrankungen wie Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis entwickelt und erfolgreich klinisch getestet wurden, sind bisher nur wenige in Mausmodellen der Demenz vom Alzheimer-Typ evaluiert worden (Choy und Panayi 2001, Stokes und Kremer 2003). Ein Grund dafür könnte die geringe Penetration der

bisher entwickelten Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke darstellen. Inzwischen weiß man jedoch, dass es unter neuroinflammatorischen Bedingungen, wie sie bei der Demenz vom Alzheimerstyp vorliegen, zu einer Abnahme der Schrankenfunktion kommt, sodass ein unkontrollierter Übertritt von kleinen Molekülen, Proteinen und Zellen in das ZNS möglich wird. Somit muss eine eingeschränkte Permeabilität über die Blut-Hirn-Schranke in zukünftigen Studien nicht zwingend ein Ausschlusskriterium der verfügbaren p38 MAPK Inhibitoren darstellen (Persidsky et al. 2006).

1.9 CNI-1493

CNI-1493 (N,N'-bis[3,5-bis[N-(diaminomethylideneamino)-C-methylcarbonimidoyl]phenyl]decanediamide tetrahydrochloride / Handelsname: Semapimod) wurde ursprünglich als Inhibitor der Aktivierung von Monozyten entwickelt (Vgl. Abbildung 4). Bianchi et al. konnten beobachten, dass CNI-1493 die Zytokin-induzierte Aktivierung monozytärer Zellen supprimieren kann. In Tiermodellen septischer Zustände konnte die Behandlung mit CNI-1493 die Letalität der Erkrankung wirkungsvoll reduziert werden (Bianchi et al. 1995). Als Wirkungsmechanismus konnten die Autoren dieser ersten Studie die Inhibition der Arginin-Aufnahme zur Produktion von NO-Radikalen durch das induzierbare Nitrit Oxidase System in Monozyten beobachten. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass nicht nur iNOS, sondern auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IL-6; durch CNI-1493 wirkungsvoll unterbunden werden kann (Bianchi et al. 1996). Ein Haupt-Wirkungsmechanismus dabei ist die Inhibition der p38 MAP Kinase (Cohen et al. 1996, Hunt et al. 1999). In zahlreichen klinischen Studien konnte die Wirkung von CNI-1493 bei der Behandlung von chronischen Entzündungszuständen wie Morbus Crohn nachgewiesen werden (Hommes et al. 2008). Darüber hinaus konnten Oke und Tracey zeigen, dass CNI-1493 auch über die Aktivierung des cholinergen antiinflammatorischen Weges zur Ausschüttung von Acetylcholin in Organen des retikuloendothelialen Systems, eine Inhibition Entzündungsreaktionen in der Milz, der Leber oder dem gastrointestinalen Systems bewirken kann. Dies wird durch die Autoren über die Aktivierung des N. vagus erklärt, was nachfolgend eine Herunterregulation der Aktivierung peripherer monozytärer Zellen zur Folge hätte (Oke und Tracey 2008). Auch in einem Tiermodell der Demenz vom Alzheimerstyp konnte die Wirksamkeit von CNI-1493 bereits gezeigt werden. Durch eine achtwöchige



1.10 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

20

flusses von CNI-1493 auf die Funktion mikroglialer Zellen war jedoch nicht Bestandteil der zitierten Arbeit.

Unter Verwendung einer mikroglialen Zelllinie sowie primärer mikroglialer Zellen soll in dieser Arbeit zunächst analysiert werden, welchen Einfluss der p38 MAPK Inhibitor auf wichtige Funktionen mikroglialer Zellen ausübt. Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass eine Aktivierung des p38 MAPK Weges im Rahmen der Demenz vom Alzheimerstyp zur Induktion einer proinflammatorischen Zytokinsekretion in Mikroglia führt. Auch eine Inhibition der Phagozytose durch diesen Signalweg konnte bereits beschrieben werden (Zhu et al. 2008). Mit Hilfe des p38 MAPK Inhibitors CNI-1493 soll daher nun überprüft werden, durch die Inhibition des p38 MAPK Weges eine Reduktion der schädlichen Zytokinsekretion erreicht und zudem die Phagozytosefähigkeit der Mikroglia verbessert werden kann. So soll untersucht werden, ob sich durch die Behandlung mit CNI-1493 bei β -Amyloid stimulierten mikroglialen Zellen der Aktivierungstyp von einem schädlichen zu einem protektiven modifizieren lässt.

Aus Untersuchungen mit peripheren monozytären Zellen ist zudem bekannt, dass eine Inhibition der p38 MAPK zur Reduktion der β -Amyloid Sekretion in diesen Zellen führt (Sondag und Combs 2010). Auch für mikrogliale Zellen wurde bereits eine Partizipation an der β -Amyloid Produktion nachgewiesen (Monning et al. 1995). In einem weiteren Teil dieser Arbeit soll daher analysiert werden, ob CNI-1493 die Produktion von β -Amyloid durch mikrogliale Zellen senken kann. Da CNI-1493 ein potenter Inhibitor der Oligomerisation von β -Amyloid ist, soll nachfolgend ermittelt werden, ob CNI-1493 in der Lage ist, mikrogliale Zellen vor einer durch toxische Oligomere induzierten Dysfunktion und Apoptose zu bewahren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte, Anlagen und Verbrauchsmaterialien

Anlage	Name	Firma
Brutschrank	Modell CB210	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Chirurgische Pinzette	Pinzette, spitz, 100mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
ELISA-Reader I	Multiscan EX	Thermo Scientific, Rockford, USA
ELISA-Reader II	Infinite® 200 series	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
FACS Tubes	BD Falcon™ 5ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	ME 235S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Flow Cytometer	BD LSR II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Gelelektrophoresesystem	Xcell SureLock™ Mini Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Geltransferkammer	XCell II™ Blot Module CE Mark	Invitrogen, Carlsbad, USA
Verbesserte Neubauer Zählkammer	BLAUBRAND®	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikroskop	eclipse TS100	Nikon, Tokio, Japan
Mikrowelle	HMT 842 C 101, 800 W	Robert Bosch GmbH, Erlangen, Deutschland
Mikrozentrifuge	Galaxy 16 DH, max. 13 000 rpm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Injektionskanülen	Sterican 16 G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
OP-Schere	Mikroskopierschere, 100mm, Edelstahl	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Reference®, 0,1-1,5; 1-20; 10-100; 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Easypet®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Anlage	Name	Firma
Platwasher	Biotrack II	General Electric, Piscataway, USA
Power Supply	Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL	General Electric, Piscataway, USA
Präparationsmikroskop	SMZ 645	Nikon, Tokio, Japan
Real-Time PCR Cycler	ABIPRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Bio-Systems, Carlsbad, CA, USA
Röntgenfilm	Clear Blue X-Ray Film	Thermo Scientific, Rockford, USA
Röntgenkassette	Cronex Cassete Quanta Detail 24 x 30 cm	Dupont, Bad Homburg, Deutschland
Rotor	#3332, max. 17 000 rpm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Rotor	#3046, max. 7500 rpm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Scanner	GS800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler I	Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Schüttler II	Unimax 1010	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Hera Safe "Laminar flow"	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Spectrophotometer	NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Transilluminator für Cybergold	E-BOX-1000-20M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 31 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortex-Schüttler	Reagenzglasschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	SUB Aqua Range 18	Grant, Cambridgeshire, UK
Zentrifuge	Biofuge Stratos	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

2.1.2 Verwendete Materialien

Tabelle 2: Aufstellung über die verwendeten Materialien

Produkt	Bezug
1, 10 – Phenanthrolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
4-Chloro-1-butanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid	BioRad, Hercules, CA, USA
Acrylamid/BIS	BioRad, Hercules, CA, USA
Agarose - 1000 Ultra pure	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
β -Amyloid 1-40	PSL, Heidelberg, Deutschland
β -Amyloid 1-42	PSL, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad injectabilia	BBraun, Melsungen, Deutschland
Bicin minimum 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bis-Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Brilliant Blau G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BSA Standard	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
CNI-1493	Dr. Yousef Al-Abed, Laboratory of Medicinal Chemistry, The Feinstein Institute for Medical Research, NY, USA
Complete [™] , EDTA free	Roche, Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Deoxycolat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HFIP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hoechst 33285	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Injektionsnadel 21G/26G	BBraun, Melsungen, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Lithiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
LPS, Escheria coli, B4	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Material und Methoden

LPS, Escheria coli, B6	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Produkt	Bezug
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumpyrophosphat-decahydrat, 99% ACS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natronlauge 1M	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ne-PER	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Novex 4-16%, Bis-Tris Gele	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Novex Blot Buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
NP-40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyvinylidenchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reagent diluent concentrate 2 (10X)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Restore™ Western Blot Stripping buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Roti® Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure, 99,99%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS, 10% in Lösung	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SDS, ultrapure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
See Blue® 2 Plus Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
SERVA® Blue G250	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sodiumfluorid	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Staurosporin, von Streptomyces sp., 95% HPLC	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Super Block® Buffer in TBS	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thiozoly Blue Tetrazolin Bromid, 97,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TMB, löslich	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
T-PER	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tricin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Tris (hydroxy methyl) aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Produkt	Bezug
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizma®	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween ® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Whatman, Protran, 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
β-Glycerophosphat-dinatriumpentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Verwendete Primer und Antikörper

Alle angeführten Antikörper wurden für Westernblots verwendet. Die Antikörper, die im Rahmen von ELISAs zum Einsatz kamen, waren alle in Kits enthalten und werden daher nicht noch einmal separat aufgeführt (siehe 2.4).

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer sowie der Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen

Primer	Bezug	
ADAM 9	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	
ADAM 10	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	
β-Aktin	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	
Primärantikörper	Bezug	Westernblot
B-Aktin (C-2)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA	1/1.000
β-Amyloid Oligomer A11, Epitop: konformationsspezifische Erkennung oligomere Strukturen (Kayed et al. 2003)	Dr. Kayed, Galveston, TX, USA	1/20.000
β-Amyloid 3D6, Epitop: Aminosäure 1-5 (Johnson-Wood et al. 1997)	Elan Pharmaceuticals, South San Francisco, CA	1/10.000
β-Amyloid 4G8, Epitop: Aminosäure 17-24 (Kim 1988)	Merck Biosciences, Darmstadt, Germany	1/5.000 - 1/2.000
β-Amyloid 6E10, Epitop: Aminosäure 1-16 (Kim 1988)	Merck Biosciences, Darmstadt, Germany	1/2.000
APP, C-terminal	Sigma, St. Louis, MO, USA	1/2.000
Anti-CD11b (Alexa 647 gekoppelt)	ebioscience, San Diego, CA, USA	1/200
GAPDH	Novus-Biologicals, Littleton, CO, USA	1/1.000
p-38 (C-20)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA	1/200
Phospho-p-38	Cell Signalling, Danvers, MA, USA	1/1.000
Sekundärantikörper	Bezug	Westernblot
goat anti-rabbit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1/7.000
goat anti-mouse	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1/10.000

2.1.4 Verwendete Kits

Tabelle 4: Aufstellung über die in der Arbeit verwendeten Kits

Kit	Bezeichnung	Bezug
Mouse IL-6 ELISA	DY406	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse TNF- α ELISA	DY410	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Mouse A β (1-40) ELISA	Cat # 294-64701	Wako, Osaka, Japan
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	K1631	Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland
RNeasy Plus Kit	Cat. No. 74134	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR Green PCR Mastermix Assay	RT-SN2X-03RT	Eurogentec, Fremont, CA, USA
Super Signal® West Dura Extendet Duration Substrate	No. 34076	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
α -secretase activity kit	FP001	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
β -secretase activity kit	FP002	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
γ -secretase activity kit	FP003	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.2 Übersicht über häufig verwendete Puffer

Alle benutzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Merck, Serva, Roth und Riedel de Haen bezogen.

Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage angesetzt.

1 x PBS

140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM K₂HPO₄; pH 7,25

NuPAGE® LDS Probenpuffer 4 x (nach Invitrogen, Carlsbad, CA)

- 106 mM Tris HCl (pH 8,5 stellt sich automatisch ein)
- 141 mM Tris base
- 2% LDS
- 10% Glycerol
- 0,51 mM EDTA
- 0,22 mM SERVA® Blue G250
- 0,175 mM Phenolrot

Lagerung bei 4 °C für maximal 6 Monate

NuPAGE® MES SDS Laufpuffer 20 x (nach Invitrogen, Carlsbad, CA)

- 50 mM MES
- 50 mM Tris base (pH 7,3 stellt sich automatisch ein)
- 0,1 % SDS
- 1 mM EDTA

Lagerung bei 4 °C für maximal 6 Monate

NuPAGE® Blotpuffer 20 x (nach Invitrogen, Carlsbad, CA)

- 25 mM Bicin
- 25 mM Bis-Tris (pH 7,2, stellt sich automatisch ein)
- 1 mM EDTA

Lagerung bei 4 °C für maximal 6 Monate

2.3 Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Zellkulturmedien und Zellarten

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Zellen und Medien

Verwendete Zellen	Bezug	Zellart	Medium
BV-2 (Blasi et al. 1990)	Prof. Jens Neumann, Magdeburg	Immortalisierte murine mikrogliale Zellen	DMEM, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% PenStrep
Primäre Mikroglia (Saura et al. 2003)		Primäre Mikroglia, isoliert aus 13 Tage alten Mäuseembryonen (Swiss E13, Janvier, Frankreich)	DMEM, 10% FCS, 1% Glutamin, 1% PenStrep

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.3.1.2 Materialien für die Zellkultur

Tabelle 7: Verwendete Zellkulturmaterialien

Medium	Bezug
DMEM, BE 12-733F	Lonza, Basel, Schweiz
GIBCO™ DMEM/F12, 31330-038; + L-Glutamin, +15 mM HEPES	Invitrogen, Carlsbad, USA
GIBCO™ Neurobasal A	Invitrogen, Carlsbad, USA
Leibovitz L 15	Sigma, St. Louis, MS, USA

Zusätze für Medien	Bezug
FBS, DE 14-850F	Lonza, Basel, Schweiz
L-Glutamin, BE 17-605E	Lonza, Basel, Schweiz
PEN-STREP, DE 17-602E	Lonza, Basel, Schweiz
GIBCO™ N-2 Supplement 100X	Invitrogen, Carlsbad, USA

Stimulation und Handhabung	Bezug
Trypsin EDTA, BE 17-161E	Lonza, Basel, Schweiz

Stimulation und Handhabung	Bezug
DPBS w/o Ca und Mg, BE 17-512F	Lonza, Basel, Schweiz
DPBS mit Ca und Mg, BE 17-513F	Lonza, Basel, Schweiz

Zellkulturmaterial	Bezug
200 ml Zellkulturflasche	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
6- and 12 well Platte	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Reagenz- und Zentrifugierrohre	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
15 ml Reagenz- und Zentrifugierrohre	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
CellScraper 25cm	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
96 well Platte für ELISA	Iwaki, Osaka, Japan
Cryovials	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland

Materialien für die Isolation primärer Zellen	Bezug
Borax	Sigma, St. Louis, MS, USA
PEI	Sigma, St. Louis, MS, USA
Filter, Porengröße 0,2µg	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

2.3.2 Kultivierung von Zellen

2.3.2.1 Handhabung der Zellen

Die Zellen wurden grundsätzlich ein Mal täglich sowie nach jedem Medienwechsel mikroskopisch und makroskopisch begutachtet. Dies diente der Beurteilung des Zellwachstums und der Zellqualität. Zudem erfolgten alle Handhabungen unter einer Sterilbank, die mindestens 15 Minuten vor Arbeitsbeginn in Betrieb genommen wurde, damit sich eine keimfreie Atmosphäre einstellte. Wichtig war, dass für alle Medienwechsel und auch für die Zellkulturexperimente eingesetzten Medien auf 37°C vorgewärmt wurden. Im Folgenden wird diese Tatsache nicht weiter explizit erwähnt. Zudem wurden alle eingesetzten Lösungen und Puffer durch Autoklavieren oder Sterilfiltration keimfrei gemacht.

2.3.2.2 Passagieren von Zellen

Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und 5-10 ml PBS auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend einige Minuten mit 1,5 ml Trypsin inkubiert. Sobald sich die Zellen lösten, wurden 10 ml Medium hinzugegeben und die Zellen anschließend bei 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden 1:20 verdünnt ausgesät.

2.3.2.3 Einfrieren von Zellen

Vor dem Sammeln der Zellen wurde zunächst das Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) auf Eis bereitgestellt. Nun wurden Mediumreste aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit DPBS gespült. Anschließend wurde 1 ml Trypsin zugegeben und der Vorgang nach 3-4 min mit 10 ml DMEM + 10 % FCS abgestoppt. Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 800 rpm für 3-5 min zentrifugiert. Aus diesem Falcon wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Kryoröhrchen überführt und in einer speziellen Einfriereinrichtung, die mit Isopropanol gefüllt ist, innerhalb von 72 h langsam auf – 80 °C gekühlt.

2.3.2.4 Auftauen von Zellen

Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese in der Regel aus so genannten Zellstocks aufgetaut. Zum Auftauen von Zellen wurde 10 ml Medium in eine Zellkulturflasche gegeben. Zudem wurde das Wasserbad auf 37 °C vorgeheizt, um ein zügiges Auftauen zu gewährleisten. Das Kryoröhrchen mit den Zellen wurde so lange in das Wasserbad getaucht, bis der Inhalt leicht angetaut war. Ein innerer Eiskern sollte noch erhalten sein. Nun wurde der Inhalt des Röhrchens in das vorbereitete Medium gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach zwei Tagen wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um das für die Zellen schädliche DMSO zu entfernen.

2.3.3 Isolation primärer Mikroglia

Primäre mikrogliale Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit aus dem Mesocortex von Mäuseembryonen isoliert (nach Saura et al. 2003). Dazu wurde das Mittelhirn aus den

Embryonen entnommen und die enthaltenen Zellen so weiterkultiviert, dass schließlich nur mikrogliale Zellen und Astrozyten überleben konnten. Die Astrozyten wurden dann in einem letzten Schritt abgetrennt, sodass lediglich die mikroglialen Zellen übrig blieben und ihre Verwendung in weiteren Versuchen finden konnten. Zunächst mussten 6-well Platten so beschichtet werden, dass Zellen mikrogliale Zellen gut auf ihnen kultiviert werden konnten.

Dazu wurde folgende Lösung verwendet:

1. 14,4 g BORAX in 800ml MilliQ lösen
2. pH auf 8,3 einstellen
3. Auf 1000 ml mit MilliQ auffüllen
4. 2 g PEI hinzufügen
5. 2 x steril filtrieren (Porengröße 0,2 µm)

Anschließend wurde jedes well mit 2 ml der Lösung für 24 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde jedes Well 4 x mit DPBS gewaschen.

Zur Präparation der Mäusehirne wurden folgende Medien verwendet:

- DMEM + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin
(steril-filtrierte, Porengröße 0,2 µm)
- L 15

Es wurden jeweils fünf trächtige Swiss Mäuse der Firma Janvier (Le Genest-St. Isle, Frankreich) für die Isolation verwendet. Die Embryonen wiesen ein Alter zwischen 13 und 14 Tagen auf. Zunächst wurde die trächtige Maus durch zervikale Dislokation und Dekapitation getötet und das Abdomen mit Alkohol desinfiziert. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet und die Embryonen aus der Fruchtblase freipräpariert. Die einzelnen Embryonen wurden nun in ein Falcon-Röhrchen gegeben, das mit L 15 Medium gefüllt war. Unter einem Präparationsmikroskop wurden die Mittelhirne herausgelöst und jeweils 15 Stück in ein steriles 15 ml Falcontube mit 2 ml L-15 Medium gegeben. Mit einer 1000 µl Pipette wurden die Hirne 25 x aspiriert, bis eine homogene Lösung entstand.

Anschließend wurde das Volumen jedes einzelnen Tubes auf 7 ml mit L 15 Medium aufgefüllt und die Röhrchen für 10 min stehen gelassen. Alle Überstände wurden nun in ein Tube überführt und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit folgenden

Volumen L 15 Medium resuspendiert: 100 µl/0,8 Embryonen. Zum Schluss wurden 400 µl der resuspendierten Lösung in die einzelnen wells gegeben und auf 1 bzw. 2 ml mit DMEM Medium + 10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % Penicillin-Streptomycin aufgefüllt. Nach jeweils 48 h wurden 500 bzw. 1000 µl des Mediums ersetzt. Im Abstand von drei Tagen wurde jeweils die Hälfte des Mediums gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 10 Tagen wurden die Zellen für weitere 2 Tage mit 8 ng/ml GM-CSF (R&D, Minneapolis, MN, USA) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und auf PEI beschichtete 12 bzw. 24 well Platten ausgesät. Die Zellen ruhten 48 h und wurden innerhalb der nächsten 72 h für entsprechende Experimente verwendet

2.3.4 Behandlung von Zellen

Vor der Behandlung von der BV-2 Zellen und primären Zellen wurden diese mit der Neubauer-Kammer gezählt und anschließend neu ausgesät. Dabei wurden entweder 60.000 Zellen für ein 12 well oder 120.000 Zellen pro 6 well verwendet. Die Zellen wurden 48 h bei 37 °C inkubiert und konnten dann mit den jeweiligen Substanzen stimuliert werden.

2.3.5 Präparation von β -Amyloid-Oligomeren

Um zu gewährleisten, dass β -Amyloid zu Beginn des Oligomerisationsprotokolls in monomerer Form vorliegt, wurde sowohl β -Amyloid₁₋₄₀ als auch β -Amyloid₁₋₄₂ jeweils in einer Konzentration von 1 µg/µl in Hexafluorisopropanol (HFIP) gelöst (Kayed et al. 2003). Das gelöste β -Amyloid wurde zu je 100 µg in Eppendorf „low bind“ Reaktionsgefäße aliquotiert und der HFIP-Alkohol unter ständigem N₂-Strom evaporiert. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden bei 4 °C bis zur entsprechenden Verwendung aufbewahrt. Zur Präparation von β -Amyloid-Monomeren wurde β -Amyloid in 10 % DMSO gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 1 µg/µl in Milli-Q verdünnt. Im Anschluss wurde diese Lösung für 10 min im Ultraschallbad behandelt, um zu gewährleisten, dass lediglich Monomere vorliegen.

Zur Herstellung von β -Amyloid-Oligomeren zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Phospho-p38 wurden jeweils 500 µg β -Amyloid in 150 µl HFIP gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf „low bind“ Reaktionsgefäß überführt.

Nach Hinzufügen von 350 µl MilliQ-Wasser und einem 2 x 5 mm Rührfischchen wurde der Deckel des Cups mit Hilfe einer 26 Gauge Nadel mit 4 Löchern versehen. Die Cups wurden

anschließend mit Hilfe einer Feinwaage gewogen. Um das HFIP aus der Präparation zu entfernen, wurde die Präparation auf einem Magnetrührer bei 20 °C bei 1000 U/min für 48 h inkubiert. Nach erneutem Wiegen wurde das evaporierte HFIP durch MilliQ ersetzt.

Um entsprechende Negativkontrollen in den Versuchen zu erhalten, wurden die beschriebenen Schritte jeweils auch ohne β -Amyloid durchgeführt. Das Resultat des Protokolls wurde regelmäßig mit Hilfe von Gelelektrophorese mit anschließendem Silver-Staining überprüft. Für die Präparation von β -Amyloid Oligomeren im Rahmen der Toxizitätsuntersuchungen und Versuchen zur Wirkung von CNI-1493 auf Oligomerisationsprozessen wurde β -Amyloid (300 μ g) nach dem Lösen in HFIP (90 μ l) und Milli-Q (210 μ l) mit 900 μ l Oligomerisationspuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,4) behandelt. Im Anschluss wurden die jeweiligen Cups mit 4 Löchern versehen und 48 h bei 20 °C auf dem Magnetrührer inkubiert (1400 U/min). Zum Abschluss wurde die Lösung noch weitere 30 min. im Vakuum bei 700 U/min behandelt. Die evaporierte Menge wurde durch den entsprechenden Oligomerisationsspuffer ersetzt. In der Arbeit wurde in der Regel β -Amyloid₁₋₄₀ verwendet. Im Rahmen der Untersuchung der Wirkung von CNI-1493 auf das Oligomerisationsverhalten von β -Amyloid wurde auch β -Amyloid₁₋₄₂ verwendet. Zudem wurden die Zytokin-Untersuchungen in der primären Zellkultur mit β -Amyloid₁₋₄₂ durchgeführt, da mehrere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass sich proinflammatorische Zytokine bei primären Zellen durch Oligomere des β -Amyloid₁₋₄₂ Proteins induzieren lassen (Jana et al. 2008, Sondag et al. 2009).

2.3.6 CNI-1493 Präparation

CNI-1493 wurde in einer Konzentration von 20 μ g/ μ l in DMSO gelöst und anschließend mit MilliQ-Wasser auf 1 μ g/ μ l verdünnt. Das gelöste CNI-1493 musste innerhalb eines Tages aufgebraucht werden, da es bei längerem Aufbewahren instabil wird und seine Wirkung einbüßt.

2.3.7 MTT-Assay

Um die Toxizität von β -Amyloid zu bestimmen, wurde der MTT-Assay verwendet (Cory et al. 1991). Der MTT-Assay ist ein kolorimetrischer Test, in dem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in lebenden Zellen zu Formazan reduziert wird

(Mosmann 1983). Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von gelb zu violett. Die Absorption des entstehenden violetten Formazans kann bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Sie lässt Rückschlüsse auf die Aktivität der mitochondrialen Reduktasen und somit indirekt über die Anzahl der lebenden Zellen zu.

Nachdem die Zellen mit den zu testenden Substanzen inkubiert worden waren, wurden die Überstände abgenommen und die Zellen zwei Mal mit sterilem PBS gewaschen, um verbliebenes Medium zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C mit neuem Medium inkubiert, welches MTT in einer Konzentration von 1 mg/ml enthält.

Das Medium wurde anschließend entfernt und die Zellen mit DMSO bei Raumtemperatur für 30 min permeabilisiert, um das entstandene Formazan zu lösen. Die Überstände wurden mit PBS verdünnt und die Absorption bei 570 nm mit einem Photometer bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Negativkontrolle und gehen als 100 % Überleben in die Kalkulation ein. Diese galten als Referenzwert, mit dem das Überleben der behandelten Zellen verglichen wurde.

2.3.8 Proteinextraktion

Zur Durchführung von Westernblots und ELISAs sowie zur Messung von Sekretase-Aktivitäten mussten sowohl Zellen als auch gewonnene Gewebeproben, wie Mäusehirne, zunächst einer Proteinextraktion unterzogen werden. Dabei kamen verschiedene Methoden zur Anwendung, je nach zu untersuchendem Kompartiment. Zudem mussten den jeweiligen Anforderungen der nachfolgenden weiteren Untersuchungsmethoden Rechnung getragen werden und somit je nach Methode spezifische Extraktionspuffer verwendet werden. So sollte beispielsweise der Extraktionspuffer für die Bestimmung der Sekretasenaktivität deren Funktionszustand nicht beeinflussen. Im Folgenden sollen die verschiedenen Extraktionsverfahren beschrieben und deren spezifische Verwendung im Rahmen dieser Arbeit erläutert werden.

2.3.8.1 RIPA-Puffer und Extraktion

Der RIPA-Puffer diente der Lyse der gesamten Zelle mit allen ihren Kompartimenten inklusive der Zellmembranen (Eisele et al. 2007). Er wurde ursprünglich zur Proteinisolation für RadiolimmunoPrecipitation-Assays (RIPA) entwickelt und wirkt durch das enthaltene SDS und

Deoxycholat stark denaturierend. Für die Messung der Sekretasenaktivitäten war dieser Puffer daher ungeeignet. Er wurde in dieser Arbeit daher zur Zellyse vor Auftrennung von Proteinen im Rahmen der Gelelektrophorese und anschließender Darstellung mithilfe des Immunoblotverfahrens verwendet.

Zusammensetzung des Puffers:

- 50mM Tris (pH 8,0)
- 150mM NaCl
- 1% NP-40
- 0,5% Deoxycholat
- 0,1% SDS

Zusätzlich wurden dem Puffer folgende Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt:

- 5mM EDTA
- 10mM NaF

Die nachfolgenden Inhibitoren wurden direkt vor der Verwendung des Puffers zugesetzt, da sie bei der Lagerung ihre Wirksamkeit einbüßen.

- 2mM 1,10-Phenanthrolin
- 1mM Na-Pyrophosphat
- 1mM β -Glycerophosphat
- 1mM Na-Orthovanadat

2.3.8.2 M-Per Puffer und Extraktion

Der M-Per (Pierce, Rockfort, IL, USA) Lysepuffer diente der Extraktion zytoplasmatischer und nukleärer Proteine. Der Puffer basiert auf einem 25 mM Bicin-Puffer (pH 7,6) und eignet sich zur Proteinaufbereitung aus Zellen, die im Rahmen von Zellkulturexperimenten gewonnen wurden. Vor der Verwendung des Puffers wurde der Proteaseinhibitor Complete™ (Roche Diagnostik, Mannheim, Deutschland) zugesetzt.

Protokoll für die Lyse von Zellen aus Zellkulturexperimenten:

Zunächst wurde das Medium aus der Zellkulturflasche oder dem Well abgenommen und die Zellen drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gesammelt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde das Cup für 5 min bei 900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit M-Per Puffer resuspendiert (1,5 ml bei Lyse einer Zellkulturflasche, 500 µl bei Verwendung einer 6 Well-Platte). Das Lysat wurde unter wiederholtem vortexen auf Eis für 5 min inkubiert und anschließend für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.3.8.3 Puffer zur Isolation von Sekretasen

Zur Extraktion der α -, β - und γ -Sekretasen wurde ein Lysepuffer der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) aus dem entsprechenden Kit verwendet.

Lyseprotokoll:

Die Zellen wurden aus der Zellkulturflasche mit einem Zellschaber gesammelt und mit eiskaltem PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Probe mit 250 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml Extraktionspuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 1 min bei 10 000 x g sedimentiert und der Überstand sofort für die weiteren Schritte des Assays verwendet.

2.3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Je nach verwendetem Lysepuffer wurde in dieser Arbeit die Proteinkonzentration in der Probe entweder über einen photometrischen Assay mit Bestimmung der Absorption bei 280 nm (Nanodrop) oder über die Bicinchoninic acid (BCA) Methode gemessen.

2.3.9.1 Nanodrop

Die Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines Spektrophotometers beruht auf der Absorption von UV-Licht durch Proteine (Stoscheck 1990). Das Absorptionsmaximum liegt dabei bei 280 nm. In dieser Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen bei der Verwendung von M-Per, T-Per und Puffer für die Sekretasen-Assays mit Nanodrop-Technik bestimmt.

Bei allen anderen Extraktionspuffern musste auf die BCA-Methode ausgewichen werden, da die Puffer Inhaltsstoffe enthalten, die die Messung stören können (z.B. SDS oder NP-40). Zur Verwendung kam das Spektrophotometer Nanodrop ND 2000 der Firma Peqlab (Erlangen, Deutschland).

2.3.9.1 BCA-Methode

Bei dieser Proteinbestimmung macht man sich die reduzierende Wirkung von Proteinen auf zweiwertiges Kupfer zunutze, welche dieses unter alkalischen Bedingungen proportional zu ihrer Konzentration zu einwertigem Kupfer reduzieren, das einen purpurnen Komplex mit BCA bildet (Smith 1985). Die Messung der Extinktion bei 562 nm ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration über eine Eichkurve. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Reaktion nicht durch andere biochemische Reagenzien wie Glukose oder DTT gestört wird.

Benötigte Reagenzien (enthalten in PIERCE BCA Protein Assay Kit):

- Bovines Serumalbumin (BSA), 2 mg/ml
- Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninic Acid (BCA) und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid)
- Reagenz B (enthält 4 % Kupfersulfat)

Experimentell wurde so vorgegangen, dass zunächst eine Verdünnungsreihe aus BSA in dem jeweiligen Lysepuffer erstellt wurde (25 bis 2000 µg/ml).

Diese wurde zusammen mit den Proben zu jeweils 25 µl in eine 96 well Platte pipettiert. Anschließend wurde Reagenz A mit Reagenz B in einem Verhältnis von 50:1 gemischt. Von diesem Reagenz wurden nun je 200 µl zu jedem well hinzugegeben. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm in einem Spektrophotometer bestimmt und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Eichkurve berechnet.

2.3.10 Eindimensionale SDS-Gelelektrophorese

Bei dieser Gelelektrophoresemethode werden Proteine in einem quervernetzten Polyacrylamidgel anhand eines elektrischen Spannungsfeldes aufgetrennt (Laemmli 1970). Dabei ist

die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel von der Nettoladung, der Masse und der Konformation des Proteins abhängig. Bei der Wanderung der Proteine im elektrischen Feld ist die Durchlässigkeit der Gelmatrix von entscheidender Bedeutung. Diese wird beeinflusst von der Konzentration des Acrylamids und dem Grad der Quervernetzung. Die Polymerisation des Acrylamids wird durch den initialen Zerfall von Ammoniumpersulfat (Origlia et al.) gestartet. Die entstehenden Radikale aktivieren Tetramethylethyldiamin (TEMED), wodurch die Polymerisationsreaktion propagiert wird.

Möchte man die Proteine im Gel nur anhand ihrer Masse und nicht auch nach Ladung und Konformation auftrennen, kann man sie durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Lithiumdodecylsulfat vor der Elektrophorese denaturieren. SDS ist negativ geladen und bindet die meisten Proteine in etwa proportional zur molekularen Masse. Das gebundene SDS verursacht also eine hohe negative Nettoladung unabhängig von der Eigenladung des Proteins. Zudem wird die native Konformation des Proteins durch dieses Detergens verändert, sodass die Proteine alle eine mehr oder weniger ähnliche Konformation im Gel aufweisen. Nun erfolgt die Auftrennung im Gel nur anhand ihrer molekularen Masse. Beim SDS-PAGE System nach Laemmli besteht das Gel aus zwei Kompartimenten, einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben), die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Die Proben werden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden.

In dieser Arbeit fanden NuPAGE Gele auf Bis-Tris Basis der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) mit einer Polyacrylamidkonzentration von 4-12 % Verwendung. Die Trenngele besitzen einen kontinuierlichen Gradienten von 4 % Polyacrylamidkonzentration zu Beginn der Laufstrecke bis 12 % am unteren Ende des Gels. Der Vorteil liegt darin begründet, dass man mit diesen Gelen Proteine mit sehr unterschiedlichen Molekularmassen auf einem Gel abbilden und unterscheiden kann. Dies war beispielsweise bei der Untersuchung von APP (>100 kDa) und dessen Spaltprodukten (ca. 10 kDa) vonnöten.

Die Proteinproben wurden mit den NuPAGE® LDS Probenpuffer im Verhältnis 3:1 versetzt und dann bei 95 °C für 5 min gekocht. Anschließend wurden je 10 µl der Proben bzw. 5 µl Marker (eine Mischung aus gefärbten Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht) in die Taschen des Gels pipettiert. Nach Zugabe von 1000 µl NuPAGE® MES Running buffer wurden die Proteine bei 200 V für 35 min im elektrischen Feld aufgetrennt.

2.3.11 Immunoblot

Der Immunoblot (Westernblot) bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, im Rahmen dieser Arbeit auf Nitrozellulose (WhatmanTM, Dassel, Deutschland) (Burnette 1981). Nachdem die zu untersuchenden Proteine durch die SDS PAGE Elektrophorese aufgetrennt wurden, wird zwischen dem Gel und der Blotmembran ein elektrisches Feld angelegt.

Die geladenen Proteine wandern dadurch in Richtung der Trägermembran und bleiben in ihr aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Anschließend sind die Proteine weiteren Methoden zugänglich. Verwendet wurde das Tank-Blot-System XCell IITM Blot der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Vorbereitung des Blotpuffers:

- 50 ml NuPAGE® Blotpuffer
- 100 ml Methanol
- 850 ml MilliQ

Folgender Aufbau des Blotmoduls wurde, von der Kathode aus gesehen, gewählt: Filterpapier/Nitrozellulose/Gel/Filterpapier. Anschließend wurden die Proteine bei 170 mA für 1 h auf die Membran transferiert. Bei besonders großen Proteinen (Darstellung von APP oder höher molekularen β -Amyloid-Oligomeren) wurde eine Stromstärke von 300 mA für zwei Stunden angelegt. Dabei musste die Kammer jedoch mit Eiswasser gefüllt sein und das Blotmodul ebenfalls in Eis gelagert werden, um die dabei entstehende Wärme suffizient abzuführen.

Sollen im folgenden APP-Fragmente oder β -Amyloid untersucht werden, wurde die Membran nach dem Blotten für 3 min in der Mikrowelle bei 600 W in PBS gekocht.

2.3.12 Memcode

Die Memcodetechnik (Pierce, Rockfort, IL, USA) erlaubt es, in wenigen Minuten eine Aussage darüber zu machen, ob die Proteine gleichmäßig vom Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran geblottet wurden. Zudem ersetzt sie in den Fällen, wo eine geeignete Ladekontrolle nicht verfügbar ist, diese. Es lässt sich also abschätzen, ob in allen Proben etwa die

gleiche Menge an Gesamtprotein enthalten ist. Zusätzlich führt sie in den weiteren Arbeitsschritten zu einer besseren Bindung der Antikörper an die geblotteten Proteine und erhöht auf diesem Wege die Sensitivität des Westernblot-Verfahrens.

Zunächst wurde die Nitrozellulosemembran mit 25 ml MemCode™ Stain für 30 s inkubiert. Um den Hintergrund zu entfärben, wurde die Membran anschließend 3 x 5 min mit MemCode™ Destain Solution und 4 x 5 min mit MilliQ gewaschen. Diente das Verfahren als Ladekontrolle, so wurde die Membran nun eingescannt.

Zum Schluss wurden die angefärbten Proteine für 2 min mit MemCode™ Stain Eraser entfärbt und die Membran 4 x mit MilliQ gewaschen. Nitrozellulose hat eine hohe Affinität zu Proteinen. Um im Weiteren eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde die Membran über Nacht in 1 x RotiBlock® geblockt.

2.3.13 Inkubation mit Antikörpern

Die Nitrozellulose wird mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert, welcher an das Protein bindet. Ein gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichteter Zweitantikörper erkennt diesen und ist seinerseits an die Meerrettichperoxidase (HRP für horse radish peroxidase) gekoppelt. Diese oxidiert in Gegenwart von H_2O_2 Luminol, dessen Elektronen in einen angeregten Zustand übergehen. Beim Zurückfallen der Elektronen in Schalen geringerer Energie werden Photonen frei, die den Film an der entsprechenden Stelle schwärzen. Als Verstärker werden Phenole eingesetzt.

Der Primärantikörper wurde in der entsprechenden Konzentration (siehe Antikörperliste) in 15 ml 1 x RotiBlock® verdünnt. Die Nitrozellulosemembran wird mit dieser Lösung entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x für 10 min mit 50 ml 1 x PBS + 0,5 % Tween® gewaschen. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in 1 x RotiBlock® gelöst und die Membran dann für 1h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Dann wurde die Membran 2 x mit 50 ml 1 x PBS + 0,5 % Tween® und einmal mit 50 ml PBS gewaschen. Jetzt wurde das Substrat ECL (enhanced chemiluminescence) im Mischungsverhältnis 1:1 hinzugegeben, die Membran durch Schütteln gleichmäßig benetzt und der Film nach einer Belichtungszeit von 1–5 Minuten entwickelt.

2.3.14 Dot-Blot

Durch die Dot-Blot-Methode lassen sich Proteine direkt auf eine Membran auftragen und auf dieser mit Hilfe von Antikörpern darstellen. Anders als bei der Gelelektrophorese werden die Proteine hierbei nicht nach ihrer Größe aufgetrennt. Es lässt sich lediglich eine Aussage darüber treffen, ob ein Antigen vorliegt, welches mit dem Antikörper reagiert. Dadurch ist die Aussagekraft der Methode gegenüber einem Westernblot erheblich eingengt. Die Vorteile der Methode liegen in der einfachen Durchführbarkeit und im geringen Einfluss auf die zu untersuchenden Proteine. Während die Proben im Rahmen der Gelelektrophorese über einen langen Zeitraum unter dem Einfluss von SDS, oder auch Temperaturschwankungen stehen, bleiben die Proteine im Dot-Blot-Verfahren in einem sehr „nativen“ Zustand. Sie werden lediglich gelöst und auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen, welche anschließend getrocknet wird. Gerade bei der Untersuchung der von β -Amyloid ist dies von enormem Vorteil. Nicht zuletzt, wenn man bedenkt, dass SDS einen starken Einfluss auf den Oligomerisationsstatus von β -Amyloid ausübt und somit die SDS-Gelelektrophorese *per se* nur eingeschränkt zu verwenden ist.

Mit Hilfe des Dot-Blot-Verfahrens wurde in dieser Arbeit der Einfluss von CNI-1493 auf den Oligomerisationsstatus von β -Amyloid untersucht. Durch die Verwendung des A11 Antikörpers konnte der Frage nachgegangen werden, ob in einer β -Amyloid Probe Oligomere des Proteins vorliegen, da dieser Antikörper konformationsspezifische Bindungseigenschaften aufweist (Kayed *et al.* 2003). Während er Monomere und kleinere oligomere Strukturen ($n < 4$) nicht erkennen kann, bindet er größere oligomere Spezies sehr spezifisch. Führt eine Präinkubation von β -Amyloid mit CNI-1493 im Vergleich zu einer Behandlung mit den Lösungsmittel der Substanz zu einem reduzierten Signal des A11 Antikörpers nach Abschluss des Oligomerisationsprotokolls, gibt dies einen Hinweis auf eine verringerte Entstehung oligomerer Strukturen, die durch den Antikörper erkannt werden können.

Durch die Verwendung eines Antikörpers, der ein lineares Epitop erkennt und damit nicht-konformationsspezifisch alle β -Amyloid Spezies bindet, lässt sich in den betreffenden Dot-Blot anschließend eine Ladekontrolle durchführen. Das Signal dieses Antikörpers sollte vor und nach der Behandlung von β -Amyloid mit CNI-1493 konstant bleiben, da CNI-1493 lediglich auf den Oligomerisationsstatus wirken sollte, während die Gesamtmenge an β -Amyloid gleich bliebe.

Durchführung des Dot-Blot-Verfahrens:

Das zu untersuchende Proteins wurden auf Nitrozellulose aufgetragen. Die Membran wurde 15 min bei 20 °C getrocknet und anschließend über Nacht mit 1 x Roti Block (50 ml) geblockt. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper für eine Stunde, im Rahmen dieser Arbeit mit dem gegen β -Amyloid Oligomere gerichteten Antikörper A11. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween® für 5 min wurde der Blot mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x mit PBS-Tween® und ein Mal mit PBS gewaschen. Als letzter Schritt folgte die Entwicklung des Blots mit Super Signal ECL Substrat (Pierce, Rockfort, CA, USA). Im Anschluss wurde der Blot gestrippt und im Rahmen einer Ladekontrolle mit dem 3D6 bzw. 4G8 β -Amyloid Antikörper inkubiert, welcher nicht konformationsspezifisch bindet und die Gesamtmenge an β -Amyloid darstellt. Sollten mehrere Antikörper getestet werden, wurde der Blot nicht gestrippt, sondern gleichzeitig mehrere Blots angefertigt.

2.3.15 Enzymatische Methoden

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität von Enzymen wird in unterschiedlichen Bereichen genutzt. Man kann sie für medizinische Labordiagnostik und zur Analyse von Stoffwechselwegen einsetzen. In dieser Arbeit ist die Messung der Aktivität von Sekretasen von Bedeutung. Darüber hinaus spielen enzymatische Methoden auch eine Rolle im Zusammenhang mit der Messung von Proteinkonzentrationen mit Hilfe von ELISAs. Am einfachsten erfolgt die Bestimmung der Aktivität von Enzymen, wenn man das Produkt ihrer katalytischen Umsetzung messen kann. Das kann je nach Verfahren sowohl densitometrisch also auch luminometrisch bzw. fluometrisch erfolgen. In den nachfolgend beschriebenen Methoden ist einerseits die fluometrische Bestimmung für die Aktivität der Sekretasen als auch die Messung über die Absorption für die verwendeten ELISAs wichtig.

2.3.15.1 α -, β -, γ -Sekretasen Assays

Neben der quantitativen Bestimmung von APP Spaltfragmenten, wie C83 oder C99, durch Westernblot lässt sich die Aktivität von Sekretasen *in vitro* auch direkt mit Hilfe eines Assays bestimmen. Dazu bedient man sich einer Peptidsequenz, die durch die Sekretase gespalten wird und dadurch ein Fluoreszenz-Signal abgibt. Dazu ist dieses Peptid an zwei verschiedene

Reportermoleküle gekoppelt. Befindet sich 5-((2-aminoethyl)amino)naphtalen-1-sulfonsäure (EDANS) in direkter Nähe zu ϵ -(4-dimethylamino-phenylazobenzoyl)-L-lysin (DABCYL), so verhindert letzteres die Fluoreszenz von EDANS wirkungsvoll. Diesen Vorgang nennt man *Quenching*.

Kommt es jedoch zur Spaltung des Peptidfragments durch die jeweilige Sekretase, so wird EDANS von DABCYL getrennt und kann dann mit 340 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Wellenlänge der Emission liegt bei 495 nm. Über die gemessene Fluoreszenz lässt sich somit eine Aussage über die Aktivität der Sekretase machen.

In dieser Arbeit kamen Kits von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) für die Bestimmung der Aktivität der α -, β - und γ -Sekretase zur Anwendung. Dabei wurden folgende Substratpeptide für die einzelnen Sekretasen verwendet:

Tabelle 9: Substratpeptide für die Sekretasenmessung

Sekretase	Substratpeptid (gekoppelt an EDANS und DABCYL)
α -Sekretase	Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-ile-Val
β -Sekretase	Arg-Glu-Glu-Val-Asn-Leu-Arg-Ala-Glu-Phe-Lys-Arg
γ -Sekretase	Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Lys

Nach der Lyse der Zellen und der Isolation der Sekretasen wie unter 2.4.9.4 beschrieben, erfolgte zunächst die Messung der Proteinkonzentration in den Lysaten. Es wurde jeweils so viel Lysat mit dem Lysepuffer verdünnt, dass pro Probe 200 μ g in 50 μ l in eine 96 well Nunc F16 Black MaxiSorp™ Platte (Roskilde, Denmark) pipetiert werden konnte. Anschließend wurde pro well 50 μ l 2 x Reaction puffer und 5 μ l Substratlösung hinzugesetzt. Die Platte wurde mit Silver Seal™ (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Germany) Abdeckfolie lichtdicht verschlossen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Exzitation wurde eine Wellenlänge von 335 nm eingesetzt. Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 495 nm.

Die Untersuchung der Sekretaseaktivität in BV-2 Zellen wurde durch Dr. Tina Katrin Wahle-Schuldt an der Katholieke Universiteit in Leuven, Belgien durchgeführt.

2.3.15.2 ELISA

Diese Methode ermöglicht den Nachweis von Proteinkonzentrationen im Bereich von sehr niedrigen Konzentrationen. In dieser Arbeit werden sogenannte Sandwich-ELISAs verwendet. Dabei werden speziell beschichtete 96 well Platten mit einem gegen das Antigen gerichteten Antikörper (sog. capture antibody) inkubiert. Diesen Schritt nennt man „coating“. Dann wird in einem zweiten Schritt das Antigen hinzugegeben. Anschließend erfolgt der Nachweis des Antigens über einen weiteren Antikörper (sog. detection antibody). Entweder ist dieser direkt an Meerrettichperoxidase (engl.: HRP) gekoppelt oder man fügt Streptavidin, gekoppelt an HRP, hinzu. Als Substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Dieses wird von der Meerrettichperoxidase in Gegenwart von H_2O_2 zu einem blauen Komplex umgesetzt. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb, der für mehrere Stunden stabil ist. Die Absorption der Lösung kann bei 450 nm gemessen werden und ist abhängig von der im well enthaltenen Menge an Antigen. Mit Hilfe einer Standardkurve kann so die Konzentration des zu untersuchenden Antigens bestimmt werden. In dieser Arbeit kommen zwei verschiedene Arten von ELISA Systemen zum Einsatz. Im Falle der Zytokin-ELISAs müssen die Platten zunächst mit dem capture antibody gecoatet und später mit einer Blocklösung inkubiert werden, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Bei der Bestimmung von β -Amyloid und sAPP α hingegen werden in den Kits bereits vorbereitete Platten mitgeliefert, die direkt mit dem Antigen inkubiert werden können.

Durchführung der Zytokin-ELISAs (IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ):

Alle ELISA-Kits wurden von der Firma R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) bezogen. Zunächst wurde der Capture antibody in steril filtriertem PBS in einer Konzentration von 4 μ g/ml (bei IL-10 und IFN- γ , bzw. 0,8 μ g/ml für TNF- α und 2 μ g/ml für IL-6) gelöst. Mit dieser Lösung wurde die 96 well Platte mit je 100 μ l Lösung pro well beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Platte 6 x gewaschen, auf Papierhandtüchern trocken geklopft und mit 300 μ l SuperBlock® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) über Nacht bei 4 °C geblockt.

Nach erneutem Waschen konnte nun die Standardkurve und die zu untersuchenden Proben auf die Platte pipettiert werden (100 μ l je well). Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur wurde der detection antibody in 1 x reagent diluent in die Konzentration

von 200 µg/ml (für TNF- α und IL-6, bzw. 300 µg/ml für IL-1 β , 400 µg/ml für INF- γ und 800 µg/ml für IL-10) verdünnt. Nachdem die Platte wiederum gewaschen und trocken geklopft worden war, wurden nun 100 µl in jedes well gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2h konnte nun das Streptavidin-HRP in 1 x reagent diluent verdünnt werden, um zu einem Volumen von 22 ml zu gelangen. Die 96 well Platte wurde erneut gewaschen und abgeklopft. Die Platte wurde jetzt mit 100 µl/well Streptavidinlösung überschichtet und für 20 min. im Dunkeln inkubiert.

Nach einem letzten Waschschrift wurde 100 µl/well Substrat (TMB) hinzugegeben und für 20 min. im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 50 µl 2 M H₂SO₄ (Sigma, St. Louis, MS, USA) in jedes well gegeben und die Absorption in einem Spektrophotometer bei 450 nm gemessen.

Durchführung der β -Amyloid ELISAs:

Hier wurden die Platten schon beschichtet und geblockt geliefert und entsprechend den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Zellkulturüberstände wurden unverdünnt eingesetzt. Anschließend wurde die Platte bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nun wurde die Platte 7 x gewaschen und anschließend auf Papierhandtüchern mehrmals trocken geklopft. Anschließend wurde der mit HRP markierte detection antibody 1:30 mit der Lösung für markierte Antikörper verdünnt und jeweils 100 µl/well in die Platte pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur wurde die Platte 9 x gewaschen und nun 100 µl/well TMB beschichtet. Nach 30 min Inkubation wurde in jedes Well 100 µl 1 M H₂SO₄ hinzugefügt und die Absorption bei 450 nm im Spektrophotometer bestimmt.

Dieser Versuch wurde in Kooperation mit Dr. Tina Wahle-Schuldt an der Katholieke Universiteit in Leuven, Belgien durchgeführt.

2.3.16 FACS-Analyse zur Untersuchung von Phagozytose durch Mikroglia

Um die Phagozytose von β -Amyloid zu untersuchen, kann man β -Amyloid mit Fluoresceiniso-thiocyanat (FITC) koppeln und die aufgenommene Menge in den Zellen anschließend in der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmen (Hayashi et al. 2009).

Die Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Methode beruht auf der Emission optischer Signale von Zellen, wenn diese einen Laserstrahl passieren. Dabei werden die Zellen zunächst in eine Kapillare angesaugt und können dann den angesprochenen Laserstrahl einzeln durchlaufen. Die Zellen streuen beim Durchlaufen des Laserstrahls einen Teil des Lichts, welcher durch verschiedene Detektoren gemessen wird. Dabei ist die Streuung des Lichts von der Größe und der Komplexität der Zelle abhängig. Somit können zum Beispiel verschiedene Zellarten im Blut von einander differenziert werden.

Eine weitere Differenzierung kann zudem durch die Markierung mit Antikörpern erreicht werden, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind und dadurch in der Durchflusszytometrie ein spezifisches Signal abgeben. Neben Antikörpern lassen sich auch Phagozytosesubstrate markieren, wodurch die Phagozytoseaktivität der Zellen detektiert werden kann.

In diesem Experiment soll sowohl die Fluoreszenz des aufgenommenen FITS-markierten β -Amyloid als auch ein Marker für Zelltod, der sogenannte Hoechst 33285-Farbstoff, gemessen werden. So kann sichergestellt werden, dass nur vitale Zellen bei der Auswertung berücksichtigt werden. Der interkalierende Hoechst 33285-Farbstoff dringt in geschädigte Zellen ein und markiert diese durch Bindung an DNA im Zellkern. Auch β -Amyloid könnte geschädigte Zellmembranen nekrotischer Zellen überwinden und daher in den Zellen akkumulieren. Es würde daher bei einem erhöhten Signal des markierten β -Amyloid in den Zellen keine echte Phagozytose der Zellen gemessen. Da man bei der FACS-Analyse aber von jeder einzelnen Zelle mehrere Fluoreszenzfarben gleichzeitig bestimmen kann, können geschädigte Zellen, die sich durch Hoechst anfärben lassen, im Nachhinein aus der Auswertung herausgenommen werden.

Durchführung der Methode:

BV-2 Zellen sowie primäre Mikroglia wurden 24 h vor Beginn des Experiments auf einer 24 well Platte ausgesät und im Inkubator bei 37 °C aufbewahrt. Anschließend wurde das Medium gegen 500 μ l neues Medium mit der zu testenden Substanz (in diesem Fall CNI-1493) bzw. dem Lösemittel der Substanz, DMSO, ausgetauscht. Nach 30 min wurden zu diesem Medium das FITS-markierte β -Amyloid₁₋₄₀ hinzupipettiert, um eine Konzentration von 2,5 μ g/ml zu erreichen. Die Inkubationszeit betrug 20 min. Das Medium wurde abgenommen

und in einem Spektrophotometer mit Fluoreszenzkanal untersucht. So konnte die im Medium verbliebene Menge an fluoreszenzmarkiertem β -Amyloid bestimmt werden. Nun wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (ohne Kalzium und Magnesium) gewaschen.

FACS-Puffer:

- PBS (pH 7,4)
- 0,1 % BSA
- 0,1 % Natriumazid
- 10 $\mu\text{g/ml}$ HOECHST-33258

Anschließend wurden die Zellen mit 1000 μl FACS-Puffer pro well gesammelt und in ein BD-FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen im Röhrchen wurden bei 4°C mit 1200 U/min herunter zentrifugiert und der Überstand bis auf 50 μl abgegossen. Bei der Verwendung von primären Zellen wurde im nächsten Schritt noch eine Inkubation mit dem Anti-CD11b (Alexa 647 gekoppelt, ebioscience, San Diego, CA, USA) Antikörper vorgenommen, welcher spezifisch mikrogliale Zellen markiert. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass im Rahmen dieses Versuches fälschlicherweise Astrozyten mit ausgezählt werden. Dabei musste im Röhrchen eine Endkonzentration des Antikörpers von 1/200 erreicht werden. Daher wurden 50 μl des 1/100 verdünnten Antikörpers in jedes Röhrchen zu dem bereits bestehenden Volumen von 50 μl hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden die Zellen wieder mit FACS Puffer überschichtet, gevortext und wiederum zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 200 μl FACS-Puffer mit Hoechst 33285-Farbstoff (1/400) resuspendiert. Die Zellen wurden im Rahmen der Durchflusszytometrie in den Kanälen FSC-A, SSC-A logarithmisch gemessen und dann im FSC-W gegen den Hoechst-Blue Kanal die toten Zellen und Aggregate ausgeschlossen.

Bei der Verwendung von primären Zellen wurden zudem nur CD11b positive Zellen ausgewertet.

2.3.17 Aufbereitung von RNA/cDNA und Real-Time PCR

2.3.17.1 Polymerase chain reaction (PCR) und Real-Time PCR

Die PCR dient der Amplifikation einer gewünschten DNA-Sequenz. Dabei kann *in vitro* DNA enzymatisch vervielfältigt werden. Zunächst werden zwei Anfangssegmente, sog. Primer, synthetisiert, welche komplementär zum entsprechenden DNA-Strang sind und den entsprechenden Sequenzabschnitt flankieren. Technisch ist zu bemerken, dass der Ansatz erst erhitzt wird, um die DNA-Doppelstränge zu trennen. Damit sich die Primer an die DNA anlagern, wird die Temperatur reduziert. Die hierfür erforderliche Temperatur ist die sog. „annealing temperature“. Das Temperaturoptimum der Polymerase liegt bei 72°C, welches anschließend für die Dauer der „elongation time“ konstant gehalten wird. Diese richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts.

Auch die Real-Time PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie die klassische PCR (Mullis & Faloona 1987). Während jedoch die Sichtbarmachung der amplifizierten DNA-Sequenz bei der PCR nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung durch die Anfärbung des Produkts, beispielsweise mit SYBR-Gold (Eurogentec, Fremont, CA, USA), entsteht, kommen bei der Real-Time PCR fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden zum Einsatz. Diese binden spezifisch an das 5'-Ende des amplifizierten PCR-Produkts. Die Fluoreszenzmarkierung dieser Sonde (Reporter) absorbiert das eingestrahlte Laser-Licht und emittiert Licht einer anderen Wellenlänge. Eine Fluoreszenzmarkierung am 3'-Ende (Quencher) absorbiert dieses Licht, wenn sich diese in unmittelbarer Nachbarschaft zum 5'-Ende befindet. Wenn die Sonde erhalten bleibt, wird daher keine Strahlung ausgesendet und kann daher nicht detektiert werden. Durch die Wirkung der Polymerase während der Elongation wird der Reporter-Farbstoff jedoch vom Quencher getrennt und kann somit durch die Kamera detektiert werden (Roth 2010).

Bei jedem PCR-Zyklus wird durch eine Kamera emittierte Fluoreszenz bestimmt. Zunächst wird eine bestimmte Anzahl an Zyklen (ca. 40 x) gefahren und bestimmt, wann das spezifische Signal die Hintergrundfluoreszenz des Versuchsansatzes überschreitet (threshold cycle oder auch C_T). Je höher die am Beginn vorhandene DNA-Menge ist, desto schneller wird der entsprechende C_T Wert erreicht (Roth 2010). In dieser Arbeit werden die DNA-Mengen relativ zu der von Aktin berechnet.

Da in dieser Arbeit mRNA quantifiziert werden soll, muss diese, nach der Behandlung, zunächst aus den mikroglialen Zellen isoliert werden. Anschließend wird die mRNA vor

Durchführung der Real-Time PCR mit Hilfe von reverse transkriptase Polymerase in cDNA umgeschrieben.

2.3.17.2 RNA-Extraktion aus BV-2 Zellen

Zur RNA-Extraktion wurde der RNeasy Plus Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und das Verfahren entsprechend den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Behandlung mit 10 μ M CN1-1493 wurden die Zellen zunächst in einen Eppendorf Cup überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgezogen und mit dem RLT-Buffer (350 μ l) lysiert. Daraufhin wurde das Zelllysate homogenisiert und 1 ml 70 % Ethanol hinzugefügt. 700 μ l dieser Probe wurde in eine RNeasy spin column überführt. Diese wurde für 15 s mit 8000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dadurch wurde die Anheftung des RNA-Materials an die Wand des speziellen RNeasy spin columns erreicht. In einem nächsten Schritt wurde die Membran mithilfe des RW1 Puffers gewaschen, indem der Puffer für 15 s mit 8000 x g durch die Membran hindurchzentrifugiert wurde. Anschließend wurde die Membran noch zwei weitere Male mit RPE Puffer (jeweils 500 μ l) gewaschen. Zunächst für 15 s bei 8000 x g und daraufhin noch einmal für 3 min bei 8000 x g. In einem letzten Schritt wird die RNeasy spin column in ein neues 1,5 ml Eppendorf cup plziert und 50 μ l RNase freies Wasser hinzugegeben, um die RNA aus der Membran zu waschen (1 min bei 8000 x g). Anschließend wurde die Konzentration der RNA-Menge mithilfe des Nano-drops, wie weiter oben beschrieben, bestimmt.

2.3.17.3 Umschreiben der mRNA in cDNA mithilfe der Reversen Transkriptase Polymerase

Vor Durchführung der Real-Time PCR muss die mRNA in DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt mithilfe der sogenannten Reversen Transkriptase Polymerase. Dafür wurde der RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon Roth, Deutschland) entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. Zur isolierten RNA wurden 1 μ l Primer und nuclease-freies Wasser hinzugeben, bis ein Volumen von 12 μ l erreicht wurde. Diese Probe wurde auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 μ l 5 x Reaktionspuffer und 1 μ l RiboLock RNase Inhibitor (20 u/ μ l) hinzugegeben. Durch den RNAase Inhibitor wird die Degradation der RNA bei Erhitzung der Probe unterbunden. Zusätzlich wurden 2 μ l mM dNTP Mix sowie 1

µl Reverse Transkriptase (RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase) hinzugefügt. Nach der Zentrifugation wurde die Probe zunächst zur Anlagerung der Primer für 5 min auf 25 °C und zur Aktivierung der Reversen Transkriptase für 60 min auf 42 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Erhöhung der Temperatur auf 70 °C für 5 min terminiert. Die so gewonnene cDNA wurde bei -80 °C bis zur Analyse durch die Real-Time PCR eingefroren.

2.3.17.4 Durchführung der Real-Time PCR

Die Real-Time PCR Untersuchungen wurden mit dem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Bio-systems, Carlsbad, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Reaktionspuffer für die Analysen diente der SYBR Green PCR Master Mix Assay (Eurogentec, Fremont, CA, USA). Einen genauen Einblick in die Zusammensetzung des Master Mix gewährt der Hersteller nicht, es wird jedoch angegeben, dass in diesem die Taq-Polymerase, die bereits beschriebenen fluoreszierenden DNA-Sonden sowie die Nukleosidtriphosphate für die Elongation enthalten sind.

Zunächst wurde mit dem Assay die optimale Primerkonzentration bestimmt. Dazu wurde zu dem 2 x SYBR Green PCR master mix (25 µl) variable Mengen der Primer (für ADAM 9 und 10, sowie β-Aktin), die cDNA (ebenfalls variable Mengen) und Wasser gegeben, um pro Versuchsansatz ein Volumen von 50 µl zu erhalten. Diese wurden in die 96 well Platte des PCR-Cyclers pipettiert.

Folgendes Programm wurde benutzt:

95°C	10 min	}	40x
95°C	15 s		
60°C	60s		
8°C	∞		

Der erste Schritt bei 95 °C ist wichtig, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Die anderen Schritte entsprechen der Denaturierung und dem Annealing bzw. Elongation, wie weiter

oben bereits beschrieben. Anschließend wurde mithilfe der Real-Time PCR System Software (Applied Bio-systems, Carlsbad, CA, USA) der Kurvenplot berechnet und die optimale Konzentration der Primer und des cDNA Reagenzes bestimmt, um eine passende Kurve zu erhalten, aus der der Threshold cycle (CT) abgelesen werden kann. Nach einer dreimaligen Reproduktion der Ergebnisse kann dann die Induktion der cDNA von ADAM 9 und ADAM 10 relativ zu β -Aktin durch CNI-1493 angegeben werden.

Die Zelllyse, RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und die Real-Time PCR wurden in Kooperation mit Dr. Tina Wahle-Schuldt an der Katholieke Universiteit in Leuven, Belgien durchgeführt.

2.4 Statistische Auswertung

Um signifikante Unterschiede zwischen zu vergleichenden Datensätzen festzustellen, wurde das Varianzanalysemodell für ungepaarte Variablen eingesetzt und die Signifikanz anhand des Students *t*-Test berechnet. Dieser dient dem Vergleich von kontinuierlichen Variablen bei unabhängigen Gruppen. Das Ergebnis des *t*-Tests ist ein *p*-Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, einen Unterschied der Mittelwerte zu beobachten, obwohl die Nullhypothese wahr ist. Diese Nullhypothese gibt an, dass eigentlich kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht (Müllner 2005). Als Analysesoftware fand Microsoft Excel (Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA) Verwendung.

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. *P*-Werte $< 0,05$ wurden in dieser Arbeit als signifikant definiert (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$).

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CNI-1493 auf die β -Amyloid Oligomerisation untersucht. Zudem wurde dargestellt, wie sich mikrogliale Zellen unter der Stimulation mit β -Amyloid verhalten. Hierbei standen die Untersuchung toxischer Effekte, die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und die Modulation von Sekretasen im Vordergrund. Zudem wurde die Phagozytose von β -Amyloid durch Mikroglia analysiert. Anschließend wurde untersucht, inwieweit CNI-1493 modulierend auf diese Aktivierung einzuwirken vermag.

3.1 Reduktion von β -Amyloid Oligomeren durch CNI-1493

3.1.1 Der Einfluss von CNI-1493 auf die *de novo* Entstehung von β -Amyloid Oligomeren

Bacher et al. konnten zeigen, dass der antiinflammatorische p38-MAPK-inhibitor CNI-1493 in der Lage ist, β -Amyloid Oligomere aufzubrechen und somit deren Toxizität zu unterbinden (Bacher et al. 2008). Mit welchen β -Amyloid Oligomeren CNI-1493 interferiert und welche Fragmente anschließend entstehen, wurde bisher noch nicht untersucht. Zur Oligomerisation von synthetischem β -Amyloid₁₋₄₀ und β -Amyloid₁₋₄₂ wurde das Protokoll von Kaye et al. so modifiziert, dass sich die entstehenden Oligomere mit Hilfe eines Westernblots darstellen ließen (Kaye et al. 2003). Vor Beginn des 48-stündigen Oligomerisationsprozesses wurden die β -Amyloid Monomerproben mit aufsteigender Konzentration von CNI-1493 behandelt, um den Einfluss von CNI-1493 auf die folgende Oligomerisation zu untersuchen. Die entsprechenden Vergleichsproben wurden mit der äquivalenten Menge an DMSO versetzt, um einen möglichen Effekt des Lösungsmittels von CNI-1493 in diesem Zusammenhang auszuschließen.

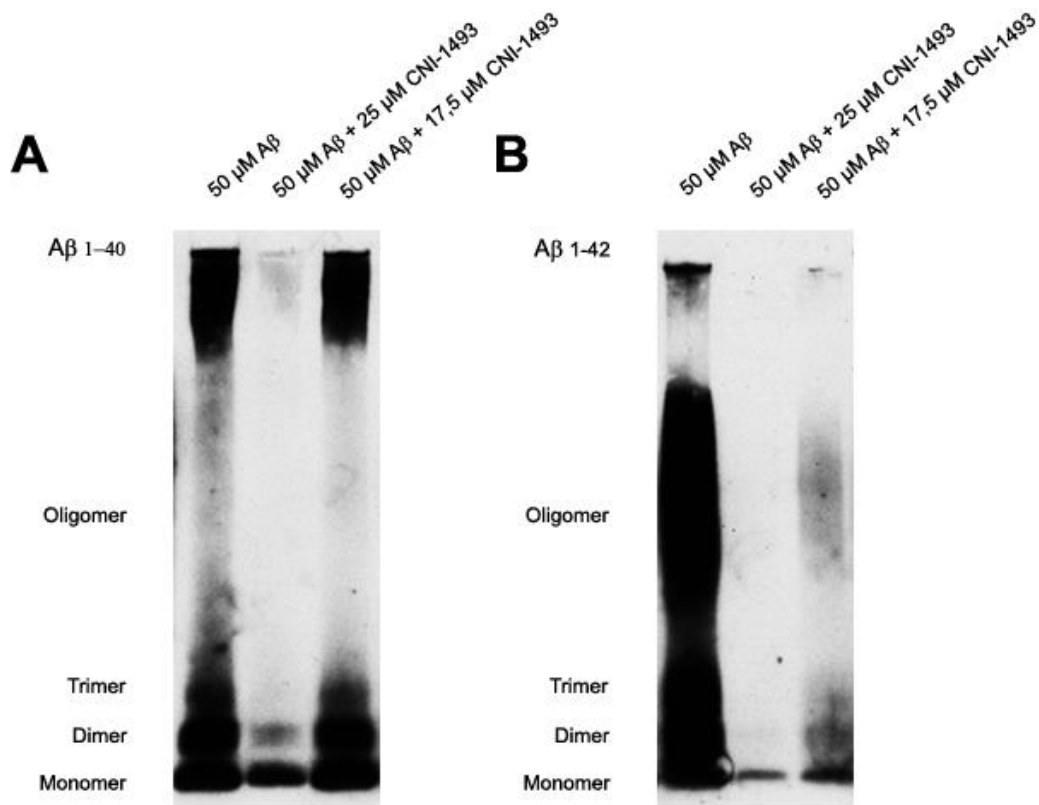


Abbildung 5: CNI-1493 hemmt die Oligomerisation von β -Amyloid. Die Präinkubation von β -Amyloid vor dem Oligomerisationsprotokoll führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Entstehung oligomerer Spezies. Hierbei ist der Effekt bei β -Amyloid₁₋₄₂ (B) stärker ausgeprägt als für β -Amyloid₁₋₄₀ (A). Beim Einsatz hoher Konzentrationen von CNI-1493 ist zudem auch eine verminderte Darstellung von monomerem β -Amyloid zu beobachten. Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt $n = 3$.

Nach Abschluss des Oligomerisationsprotokolls ließen sich sowohl für β -Amyloid₁₋₄₀ (Abbildung 5A) als auch β -Amyloid₁₋₄₂ (Abbildung 5B) Oligomere im durchgeführten Westernblot nachweisen. Mit zunehmender Konzentration von CNI-1493 konnte die Aggregation zu Oligomeren bei beiden Peptiden nahezu vollständig unterbunden werden. Zusätzlich zu diesem Effekt führte CNI-1493 zur Bildung von unlöslichen β -Amyloid Aggregaten, die präzipitieren. Daher war auch bei hohen Konzentrationen von CNI-1493 eine verminderte Darstellung von β -Amyloid-Monomeren nachzuweisen. Ein Effekt des Lösungsmittel DMSO konnte auch in der höchsten Konzentration des Lösungsmittels nicht beobachtet werden. Anschließend wurden die Westernblots densitometrisch ausgemessen, um die Wirkung von CNI-1493 auf die β -Amyloid Oligomerisation zu quantifizieren (Abbildung 6).

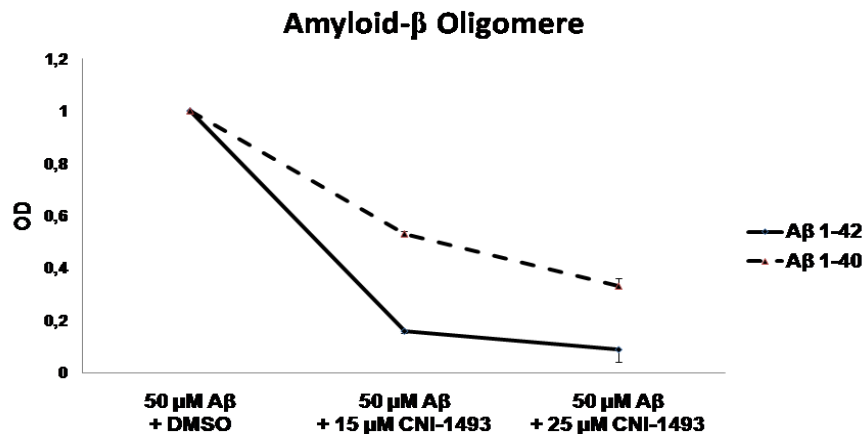


Abbildung 6: CNI-1493 unterbindet die Oligomerisation von β -Amyloid₁₋₄₂ stärker als die von β -Amyloid₁₋₄₀. In der densitometrischen Auswertung der Oligomere $n > 4$ von Abbildung 4 wird deutlich, dass die Aggregation von β -Amyloid zu oligomeren Aggregationsformen in Anwesenheit von CNI-1493 stark reduziert ist. Dabei lässt sich durch die Inkubation mit CNI-1493 für das β -Amyloid₁₋₄₂ Peptid ein stärkerer Effekt auf die feststellen als für β -Amyloid₁₋₄₀. Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt $n = 3$.

In der densitometrischen Auswertung wird deutlich, dass CNI-1493 die Aggregation zu Oligomeren des β -Amyloids sehr wirkungsvoll unterbinden konnte. Es ist ersichtlich, dass CNI-1493 in der Lage ist, die Aggregation zu Oligomeren von β -Amyloid₁₋₄₀ und auch β -Amyloid₁₋₄₂ zu hemmen. Es lässt sich außerdem erkennen, dass der Effekt von CNI-1493 auf β -Amyloid₁₋₄₂ stärker ausgeprägt ist als der auf β -Amyloid₁₋₄₀.

3.1.2 CNI-1493 reduziert Oligomere des β -Amyloid Proteins im Dot-Blot-Verfahren

Ein weiteres Verfahren zur Untersuchung von β -Amyloid-Oligomeren ist das Dot-Blot-Verfahren. Zur Detektion von oligomerem β -Amyloid im Rahmen des Dot-Blot-Verfahrens wurde der konformationsspezifische Antikörper A11 verwendet, der β -Amyloid nur erkennen soll, wenn es in oligomerer Konformation vorliegt. Dementsprechend ließen sich Monomere durch den A11 Antikörper nicht nachweisen, während die Auftragung des oligomerisierten β -

Amyloid₁₋₄₀ ein entsprechendes Signal im Dot-Blot-Verfahren ergab. Eine konstante Proteinmenge wurde durch die Verwendung des nicht-konformationsspezifischen Antikörpers 4G8 gewährleistet (Abbildung 7A).

Nach der Koinkubation von β -Amyloid₁₋₄₀ mit CNI-1493 während des Aggregationsprozesses ließ sich ein deutlich verringertes Signal im Dot-Blot-Verfahren unter Verwendung des Antikörpers A11 detektieren. In Analogie zur Darstellung mithilfe des Westernblot Verfahrens (vgl. Paragraph 3.1.1) ließ sich durch die Inkubation von β -Amyloid₁₋₄₀ mit CNI-1493 die Aggregation zu oligomeren β -Amyloid wirkungsvoll reduzieren. Die Entwicklung des Blots mit dem Antikörper 3D6, der β -Amyloid unabhängig von seiner Konformation erkennt, ergab sich eine konstante Proteinmenge (B).

Im Weiteren wurde untersucht, ob die Abnahme der β -Amyloid Oligomere durch CNI-1493 auch mit einer verminderten Toxizität des Amyloid-Proteins einhergeht.

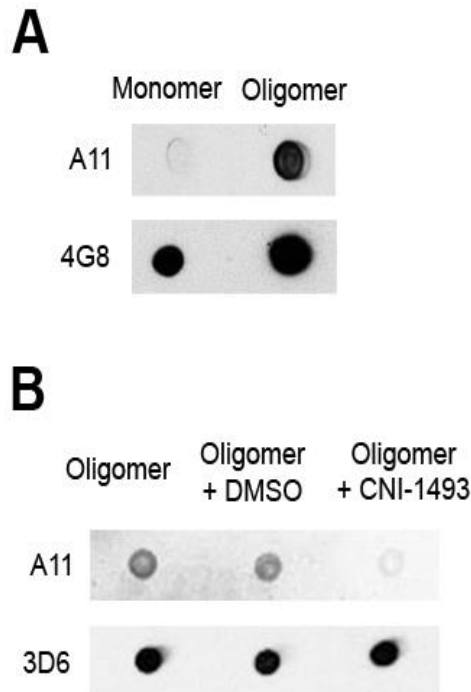


Abbildung 7: CNI-1493 reduziert β -Amyloid Oligomere. Während Monomere durch den A11 Antikörper nicht detektiert werden können, lassen sich Oligomere im Dot-Blot-Verfahren darstellen. Eine konstante Proteinmenge wird durch Verwendung des nicht-konformationsspezifischen Antikörpers 4G8 gewährleistet (A). Die Koinkubation von β -Amyloid₁₋₄₀ mit CNI-1493 führt zur reduzierten Darstellung von Oligomeren durch den A11 Antikörper. Bei der Verwendung des nicht-konformationsspezifischen Antikörpers gegen β -Amyloid 3D6 zeigt sich wiederum eine konstante Peptidmenge (B). Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus n = 3 unabhängigen Versuchen.

3.2 β -Amyloid₁₋₄₀-Oligomere führen zur Schädigung von mikroglialen Zellen

Ob β -Amyloid Oligomere auch schädigend auf mikrogliale Zellen wirken wurde bisher nur unzureichend untersucht. Diese Untersuchung bildete daher den Gegenstand der folgenden Versuche. Zudem sollte analysiert werden, ob CNI-1493 auch mikrogliale Zellen wirkungsvoll vor einer β -Amyloid-Oligomer induzierten Schädigung bewahren kann.

Um die toxische Wirkung von β -Amyloid zu prüfen, wurden Oligomere aus β -Amyloid₁₋₄₀, wie unter 2.4.6 beschrieben, hergestellt und deren Wirkung auf die mikrogliale Zelllinie BV-2 sowie auf primäre mikrogliale Zellen untersucht. Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist

die toxische Wirkung von β -Amyloid-Oligomeren auf neuronale Zellen bereits ausführlich durch andere Autoren untersucht worden. In einigen Publikationen ergaben sich jedoch auch Hinweise für eine schädigende Wirkung auf mikrogliale Zellen. Eine Toxizitätsanalyse der Wirkung von β -Amyloid auf mikrogliale Zellen ist daher Bestandteil dieser Arbeit. Alle Experimente wurden zunächst an der mikroglialen BV-2 Zelllinie durchgeführt, da sich experimentelle Bedingungen in der Zellkultur mit einer Zelllinie einfacher modulieren lassen. Primäre Zellen hingegen sind weitaus empfindlicher in der Handhabung. Darüber hinaus ist eine ethische Begründung ins Feld zu führen, dass primäre Experimente, in denen Konzentrationen oder Puffer zunächst auszutesten sind, zunächst in mithilfe einer Zelllinie optimiert werden können, bevor man die aufgestellten Hypothesen an primären Zellen, die aus Mäuseembryonen gewonnen werden, überprüft. Die zentralen Experimente wurden jedoch an primären Zellen wiederholt, da diese das Verhalten von mikroglialen Zellen in der *in vivo* Situation im Mausgehirn besser abbilden können. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit aufsteigender Konzentration von β -Amyloid Oligomeren inkubiert. Als Vergleich diente die Behandlung mit β -Amyloid Monomeren in den entsprechenden Konzentrationen.

Im durchgeführten MTT-Assay zeigte sich sowohl für mikrogliale BV-2 Zellen (Abbildung 8A) als auch für primäre mikrogliale Zellen (Abbildung 8B) ein konzentrationsabhängiger toxischer Effekt von β -Amyloid Oligomeren. Im Vergleich dazu führten Monomere des β -Amyloid nicht zum Zelltod derselben.

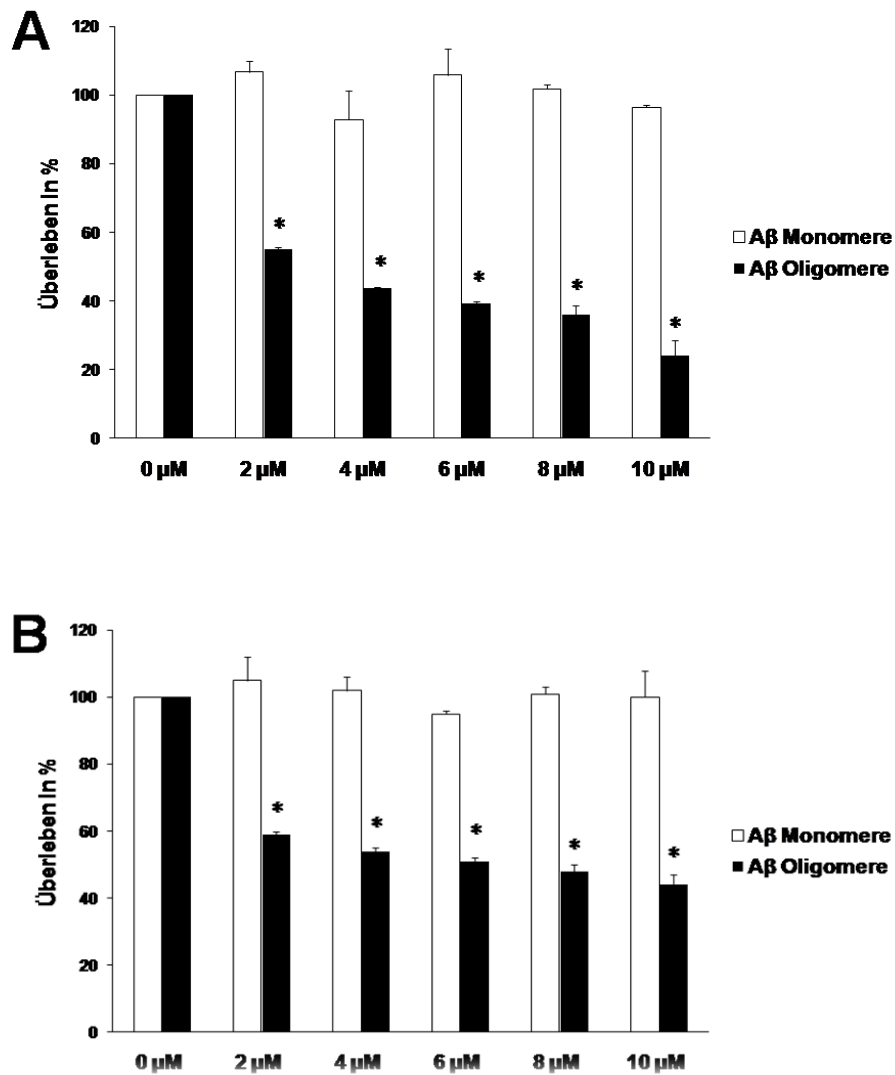


Abbildung 8: β -Amyloid₁₋₄₀ Oligomere führen zum Zelltod mikroglialer Zellen. Monomeres β -Amyloid₁₋₄₀ bewirkte keine Schädigung von mikroglialen BV-2 Zellen (A) und primärer Mikroglia (B). Die Inkubation mit oligomerem β -Amyloid₁₋₄₀ führte hingegen dosisabhängig zum Zelltod in beiden Zellarten. Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt $n = 3$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.3 CNI-1493 verhindert den Zelltod von mikroglialen Zellen

3.3.1 CNI-1493 reduziert den β -Amyloid₁₋₄₀-induzierten Zelltod von mikroglialen Zellen

In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung von CNI-1493 auf den β -Amyloid induzierten Zelltod von BV-2 Zellen sowie primären mikroglialen Zellen untersucht. Dazu wurde β -Amyloid₁₋₄₀ während des Oligomerisationsprozesses mit CNI-1493 oder dem Lösungsmittel DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit 2,5 μ M, 5 μ M oder 10 μ M des mit CNI-1493 behandelten β -Amyloid inkubiert. Hierbei ließ sich sowohl für die Zelllinie BV-2 (Abbildung 9A) als auch für primäre mikrogliale Zellen (Abbildung 9B) eine Reduktion des β -Amyloid induzierten Zelltodes durch die Behandlung mit CNI-1493 feststellen.

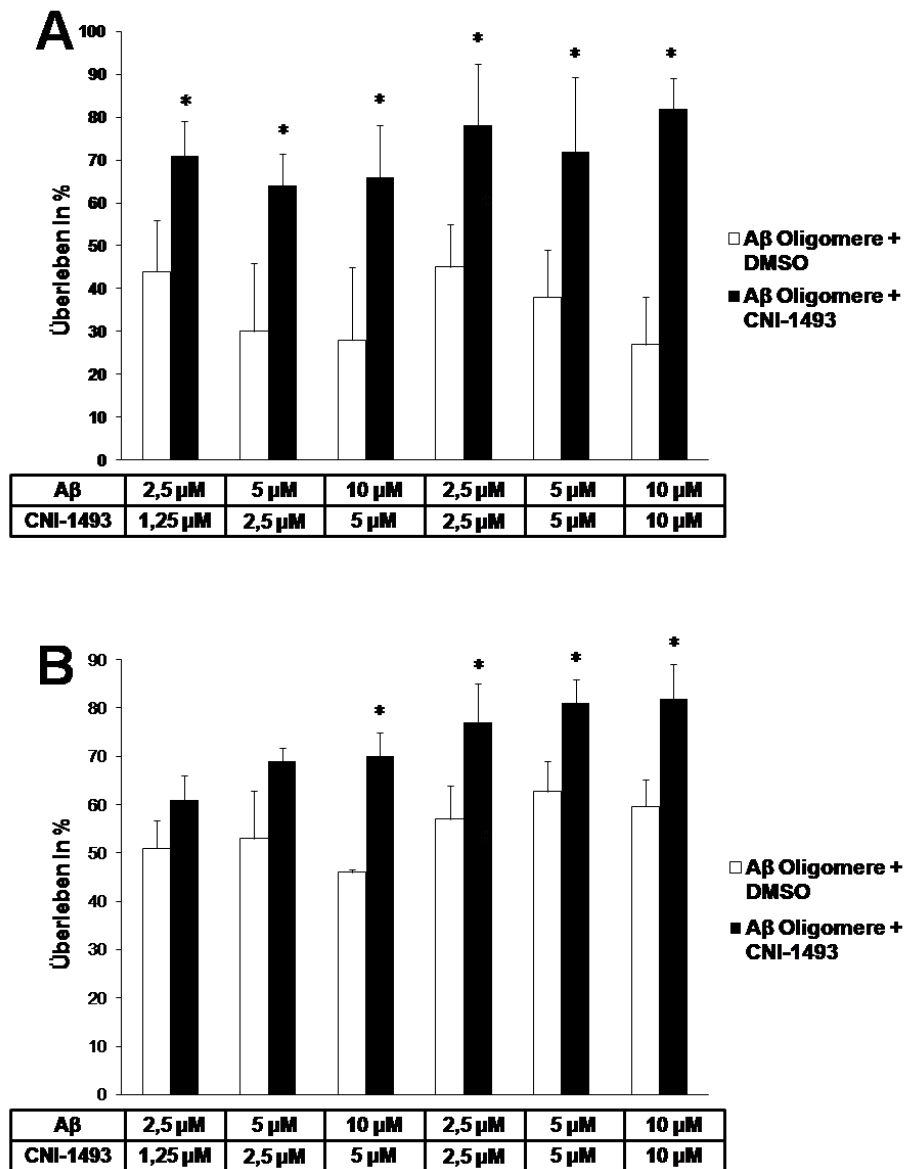


Abbildung 9: CNI-1493 reduziert den β -Amyloid₁₋₄₀-induzierten Zelltod mikroglialer Zellen. Die Präinkubation von β -Amyloid₁₋₄₀ mit CNI-1493 vor der Oligomerisation unterbindet die Entstehung toxischer Oligomere. Dadurch lässt sich der β -Amyloid-induzierte Zelltod von mikroglialen BV-2 Zellen (A) und primärer Mikroglia (B) reduzieren. Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt n = 3. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.3.2 CNI-1493 verhindert nicht den Staurosporin-induzierten Zelltod von BV-2 Zellen

Um zu überprüfen, ob die Wirkung von CNI-1493 hinsichtlich einer Verbesserung des Überlebens auch in der Zellkultur spezifisch für den β -Amyloid-induzierten Zelltod ist, wurde untersucht, ob CNI-1493 in der Lage ist, den Staurosporin-induzierten Zelltod zu unterbinden. Staurosporin ist ein unspezifischer Proteinkinaseinhibitor, der stark Apoptose-induzierend wirkt (Chae et al. 2000). Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, hat CNI-1493 keinen protektiven Effekt in diesem Versuch. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die protektive Wirkung von CNI-1493 spezifisch für den β -Amyloid-Oligomer-induzierten Zelltod ist. Bei der Konzentration von 1 μ M Staurosporin lässt sich eine zusätzliche Toxizität bei der Koinkubation von Staurosporin und CNI-1493 erkennen.

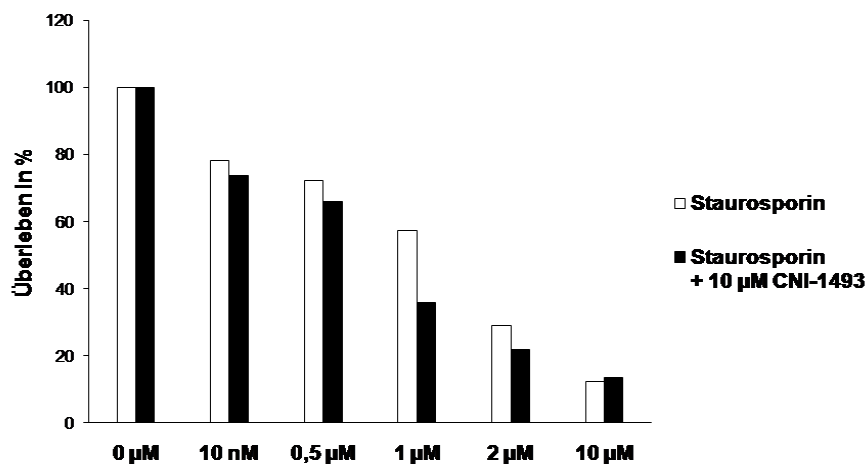


Abbildung 10: CNI-1493 übt keinen Einfluss auf den Staurosporin-induzierte Zelltod aus. Die Inkubation von mikroglialen BV-2 Zellen mit Staurosporin führt zum dosisabhängigen Zelltod mikroglialer BV-2 Zellen. Durch eine Koinkubation mit CNI-1493 lässt sich dieser Effekt nicht beeinflussen. Dieser Versuch stellt eine Reproduktion eines Ergebnisses von Bacher et al. in mikroglialen Zellen dar (Bacher et al. 2008). Daher wurde er zur Bestätigung nur einfach durchgeführt (n = 1). Angegeben sind die Mittelwerte.

3.4 CNI-1493 vermindert die Sekretion von β -Amyloid₁₋₄₀-induzierten proinflammatorischen Zytokinen durch mikrogliale Zellen

Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine stellt einen wesentlichen Mechanismus der Induktion von Neuroinflammation durch Mikroglia dar (Akiyama et al. 2000). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte die Bedeutung von proinflammatorischen Zytokinen im Rahmen der Demenz vom Alzheimerstyp bereits gezeigt werden (Rojo et al. 2008).

In dem folgenden Abschnitt wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss Oligomere des toxischen β -Amyloid auf BV-2 Zellen und primäre mikrogliale Zellen in diesem Zusammenhang ausüben. Anschließend wurde CNI-1493 eingesetzt und überprüft, inwieweit die Substanz diese Zytokinprofile moduliert. Wir verwendeten für die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen die β -Amyloid₁₋₄₀-Konzentrationen 5 und 10 μ M, da sich diese Konzentrationen in den vorhergehenden Experimenten zur Toxizitätsanalyse als wirksame Konzentrationen zur Induktion von Zellstress erwiesen hatten (Vgl. Paragraph 3.3)

3.4.1 Die β -Amyloid₁₋₄₀-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch mikrogliale BV-2 Zellen lässt sich durch CNI-1493 reduzieren

Bereits sechs Stunden nach der Inkubation mit β -Amyloid₁₋₄₀ Oligomeren ließ sich bei BV-2 Zellen eine erhöhte Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α nachweisen. Diese Sekretion konnte durch die Koinkubation mit CNI-1493 dosisabhängig auf den Ausgangswert unstimulierter Zellen herunter reguliert werden (Abbildung 11A). Zur Induktion von IL-6 durch Amyloid-Oligomere musste ein Inkubationsintervall von 24 h gewählt werden. Hier konnte zwar keine signifikante Induktion des Zytokins IL-6 gesehen werden, es konnte jedoch ein Trend festgestellt werden. Der Einfluss von CNI-1493 im Sinne einer dosisabhängigen Reduktion der Zytokinausschüttung stellte sich jedoch auch hier signifikant dar (Abbildung 11B).

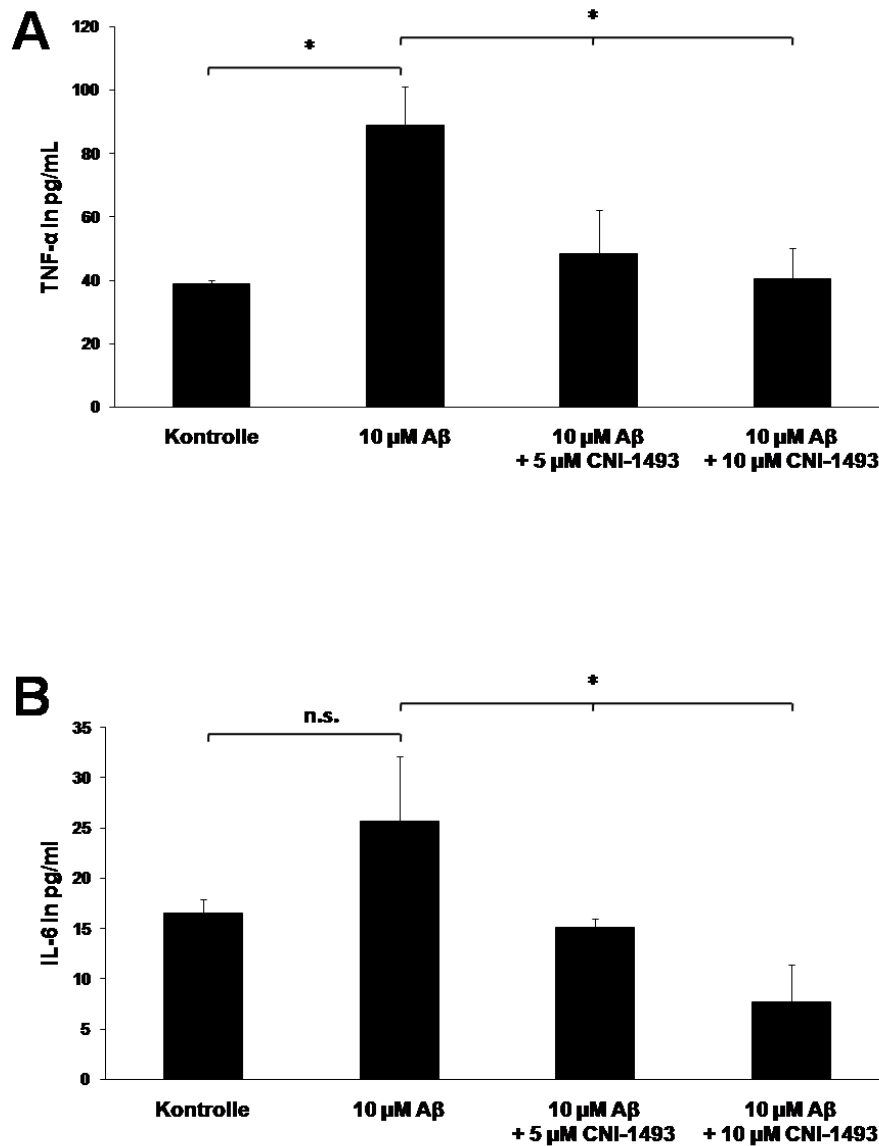


Abbildung 11: CNI-1493 reduziert die Sekretion β -Amyloid₁₋₄₀-induzierter Zytokine durch mikrogliale BV-2 Zellen. Die Inkubation von mikroglialen BV-2 Zellen mit 10 μ M β -Amyloid₁₋₄₀ Oligomeren führt zur erhöhten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α (A) und IL-6 (B), wobei für das Zytokin IL-6 nur ein Trend detektiert werden konnte ($p > 0,05$). Die Koinkubation der Zellen mit CNI-1493 führt zur dosisabhängigen Reduktion der Zytokinsekretion. Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt $n = 3$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.4.2 Die β -Amyloid₁₋₄₂-induzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch primäre Mikroglia lässt sich durch CNI-1493 reduzieren

Nachdem bereits für die BV-2 Zelllinie eine Induktion proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend untersucht, ob sich die Beobachtungen auch auf die primäre Zellkultur übertragen lassen. Primäre mikrogliale Zellen wurden hierfür für 48 h mit jeweils 5 μ M und 10 μ M β -Amyloid₁₋₄₂ Oligomeren inkubiert. Wie bereits im Material und Methodenteil dargestellt, ist bei der Induktion von Zytokinen in der primären Zellkultur β -Amyloid₁₋₄₂ ein viel stärker Induktor der Entzündungsreaktion. Daher wurden im Unterschied zu den Vorversuchen mit BV-2 Zellen für diesen Versuchsansatz β -Amyloid₁₋₄₂ Oligomere verwendet. Für 10 μ M β -Amyloid₁₋₄₂ konnte sowohl für TNF- α (Abbildung 12A) als auch für IL-6 (Abbildung 12B) eine erhöhte Zytokinsekretion beobachtet werden. In Analogie zu den Experimenten mit den BV-2 Zelllinien konnte auch hier eine Reduktion der Zytokinausschüttung durch die Koinkubation mit CNI-1493 erreicht werden.

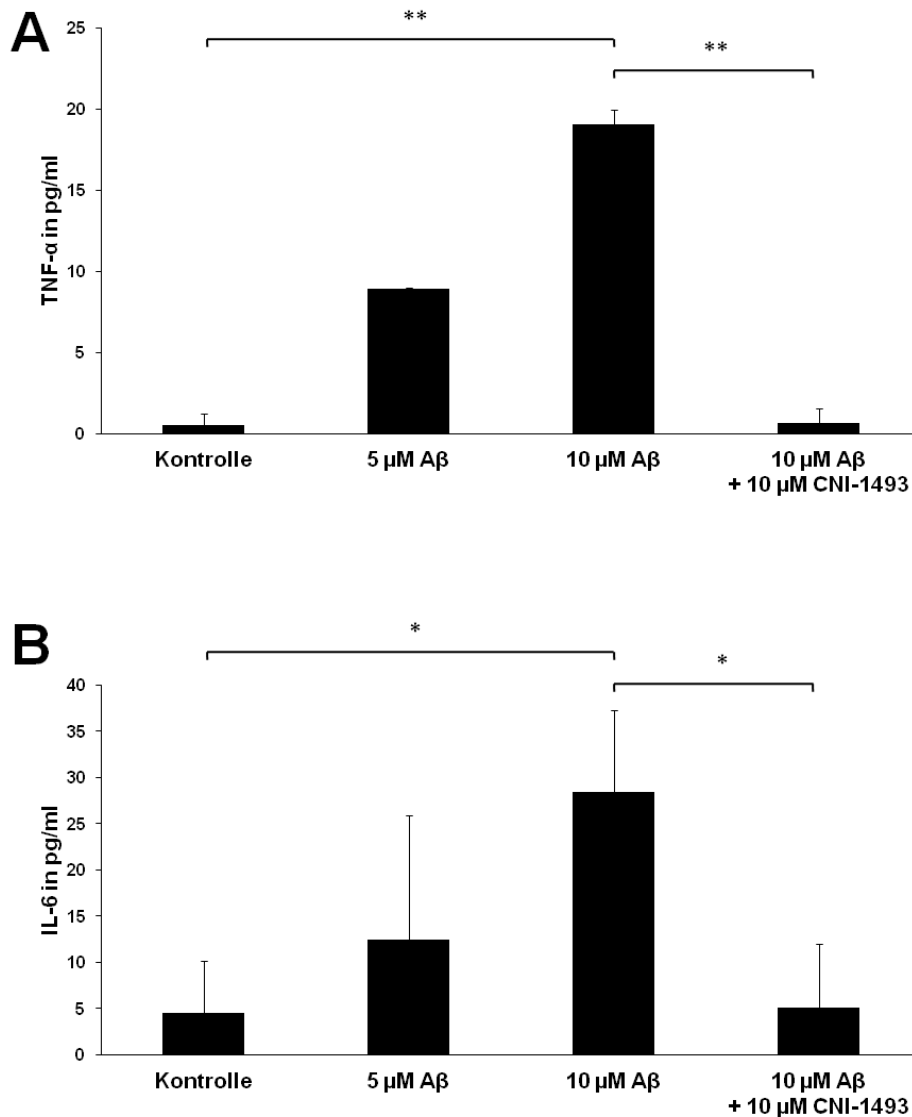


Abbildung 12: CNI-1493 reduziert die Sekretion β -Amyloid₁₋₄₂-induzierter Zytokine durch primäre mikrogliale Zellen. Die Inkubation von primären mikroglialen Zellen mit 10 μ M β -Amyloid₁₋₄₂ Oligomeren führt zur erhöhten Sekretion von TNF- α (A) und IL-6 (B), wobei für das Zytokin IL-6 nur ein Trend beobachtet werden konnte ($p > 0,05$). Die Koinkubation mit 10 μ M CNI-1493 reduziert die Induktion der Zytokine. Auch hier lässt sich für IL-6 lediglich ein Trend finden ($p > 0,05$). Dieser Versuch dient der Reproduktion der Ergebnisse aus der Zellkultur mit den BV-2 Zellen. Er wurde daher in Duplikaten nur einfach durchgeführt. Das Ergebnis konnte jedoch anschließend durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe mehrfach reproduziert werden. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.4.3 CNI-1493 reduziert die β -Amyloid₁₋₄₀ induzierte Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges

Zhu et al. konnten zeigen, dass die β -Amyloid-vermittelte Induktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 durch den p38 MAPK Weg reguliert wird (Zhu et al. 2008). Um der Frage nachzugehen, wie CNI-1493 die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine bewirkt, wurde daher auch in dieser Arbeit die Regulation des p38 MAPK Weges untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass β -Amyloid₁₋₄₀-Oligomere zur Phosphorylierung beitragen und damit zur Aktivierung des p38 MAPK Weges führen (Abbildung 13). Durch die Koinkubation mit 10 μ M CNI-1493 konnte die Aktivierung des p38 MAPK Weges wirkungsvoll unterbunden werden.

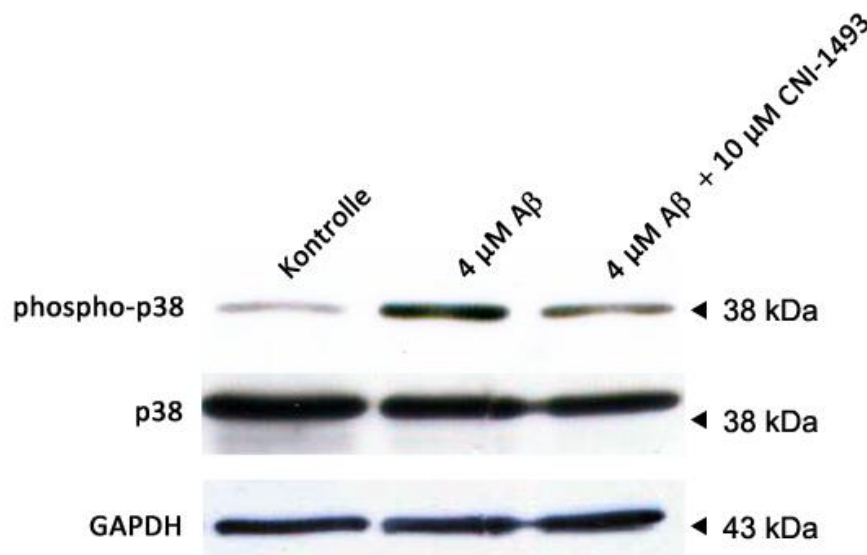


Abbildung 13: CNI-1493 reduziert die β -Amyloid₁₋₄₀ induzierte Aktivierung des p38 MAPK Signalweges. Durch die Inkubation von mikroglialen BV-2 Zellen mit 4 μ M β -Amyloid₁₋₄₀-Oligomeren lässt sich die Induktion des p38 MAPK Weges nachweisen. Die Koinkubation mit 10 μ M CNI-1493 kann diese Aktivierung wirkungsvoll unterbinden. GAPDH dient als Ladekontrolle, um eine konstant eingesetzte Proteinmenge zu gewährleisten. Dieses Experiment stellt eine Reproduktion der Ergebnisse von Cohen et al. in mikroglialen Zellen dar und wurde daher nur einfach durchgeführt (Cohen et al. 1996).

3.4.4 CNI-1493 reduziert die LPS-induzierte IL-6-Sekretion mikroglialer Zellen

Wie bereits in Paragraph 3.1 dargestellt, führt CNI-1493 zur Reduktion von β -Amyloid-Oligomeren. Die durch CNI-1493 vermittelte Reduktion der β -Amyloid-induzierten Zytokinsekretion könnte somit durch die direkte Wirkung auf β -Amyloid-Oligomere bedingt sein.

Um zu überprüfen, ob CNI-1493 auch über diesen Effekt hinaus Einfluss auf die Zytokinsekretion mikroglialer Zellen nimmt, wurde die LPS-induzierte Sekretion von IL-6 analysiert. Durch die Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS ließ sich in primären mikroglialen Zellen eine starke Sekretion des Zytokins IL-6 induzieren, die durch die Koinkubation mit CNI-1493 reduziert werden konnte (Abbildung 14).

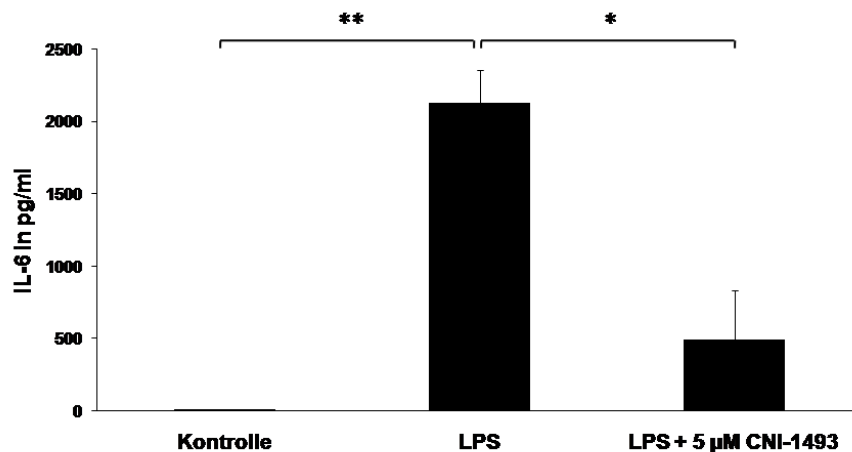


Abbildung 14: CNI-1493 reduziert die LPS-induzierte Zytokinsekretion primärer mikroglialer Zellen.

Die Inkubation von primären mikroglialen Zellen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS induziert die Sekretion von IL-6. Durch eine Koinkubation mit 5 μM CNI-1493 lässt sich diese Zytokinsekretion wirkungsvoll reduzieren. Dieses Experiment stellt eine Reproduktion der Ergebnisse von Bianchi et al. und wurde daher nur einfach in Duplikaten durchgeführt (Bianchi et al. 1996). Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.5 CNI-1493 induziert die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in Mikroglia

Neben der Sekretion von Zytokinen ist die Phagozytose eine wichtige Funktion mikroglialer Zellen. Im folgenden Teil der Arbeit wurde daher untersucht, ob mikrogliale BV-2 Zellen und

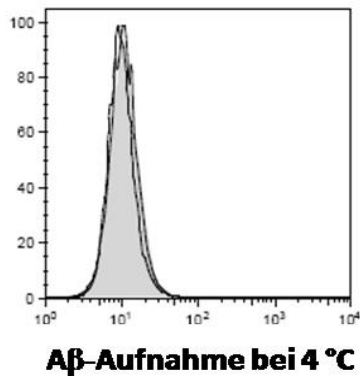
primäre Mikroglia zur Aufnahme von β -Amyloid fähig sind. Zudem wurde überprüft, ob CNI-1493 modulierend auf die Aufnahme von β -Amyloid einzuwirken vermag.

3.5.1 CNI-1493 erhöht die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in mikrogliale BV-2 Zellen

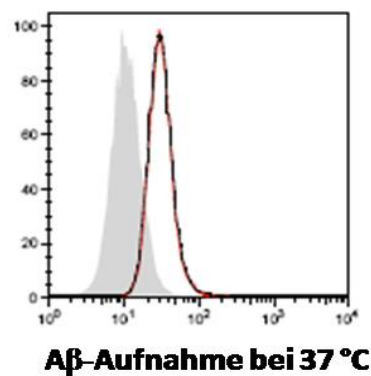
Zur Untersuchung der Phagozytose mikroglialer Zellen wurden die Zellen mit FITC-markiertem β -Amyloid₁₋₄₀ inkubiert und anschließend die Aufnahme mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt (Vgl. Paragraph 2.4.17).

Zunächst wurde untersucht, ob mikrogliale BV-2 Zellen β -Amyloid₁₋₄₀ aufnehmen. Während bei 4 °C keine Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ detektiert werden konnte (Abbildung 15A), ließ sich bei 37 °C bereits nach 20 min. eine intrazelluläre Anreicherung des Peptids in Mikroglia messen (Abbildung 15B). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in mikrogliale Zellen einen energieabhängigen Prozess darstellt. Die Aufnahme von β -Amyloid ist damit nicht einfach als passive Aufnahme anhand eines Konzentrationsgradienten zu betrachten, sondern stellt vielmehr einen aktiven Prozess dar. In einem weiteren Versuch wurden mikrogliale BV-2 Zellen für 30 min mit CNI-1493 präinkubiert und anschließend die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem β -Amyloid₁₋₄₀ gemessen. Hierbei konnte eine starke Zunahme der Aufnahme von β -Amyloid beobachtet werden (Abbildung 15C).

A



B



C

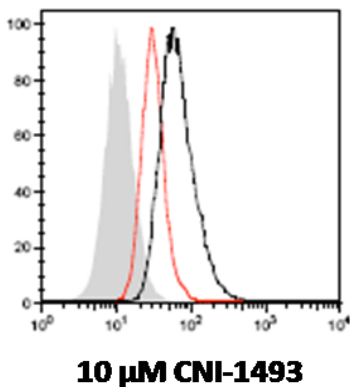


Abbildung 15: Die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in mikrogliale Zellen lässt sich durch CNI-1493 steigern. Bei 4 °C lässt sich keine Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem β -Amyloid₁₋₄₀ in mikrogliale BV-2 Zellen zeigen (A). Die Fluoreszenz unbehandelter (grau) und mit β -Amyloid₁₋₄₀ inkubierter Zellen (schwarz) weicht nicht voneinander ab, daher decken sich die Kurven in der entsprechenden Abbildung. Bei 37 °C lässt sich dagegen eine Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in die Zellen messen (B). Die Fluoreszenz der mit β -Amyloid₁₋₄₀ behandelten Zellen ist höher als die der unbehandelten, die schwarze Kurve weicht daher nach rechts ab. Präinkubiert man die Zellen für 30 min mit 10 μ M CNI-1493 lässt sich die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in die Zellen weiter erhöhen (C). Die Kurve der mit β -Amyloid₁₋₄₀ und CNI-1493 behandelten Zellen (schwarz) ist gegenüber der Kurve mit β -Amyloid₁₋₄₀ und Lösungsmittel behandelten Zellen (rot) nach rechts verschoben. Die graue Kurve gibt auch hier die Fluoreszenz vollständig unbehandelter Zellen wieder. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.5.2 CNI-1493 erhöht die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in primäre mikrogliale Zellen

In einem weiteren Schritt wurde die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in primäre mikrogliale Zellen unter dem Einfluss von CNI-1493 untersucht. Dabei ließ sich eine konzentrationsabhängige Induktion der Aufnahme von β -Amyloid detektieren (Abbildung 16A +B).

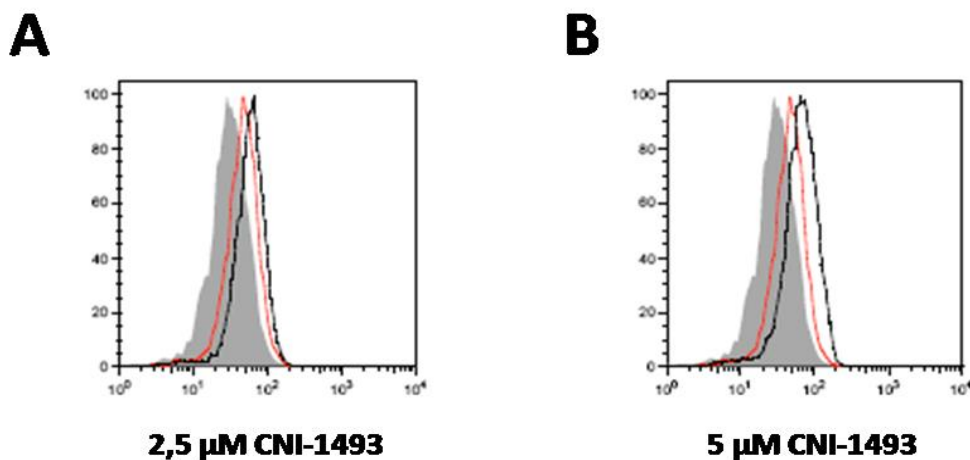


Abbildung 16: CNI-1493 steigert die Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in primäre Mikroglia. Die Inkubation von primären mikroglialen Zellen mit fluoreszenzmarkiertem β -Amyloid₁₋₄₀ führt zur Aufnahme des Peptids in die Zellen. Die Fluoreszenzkurve der Zellen, die mit β -Amyloid₁₋₄₀ behandelt wurden (rot), ist daher gegenüber der Fluoreszenzkurve unbehandelter Zellen (grau) nach rechts verschoben. Die Präinkubation mit 2,5 μ M (A) und 5 μ M CNI-1493 (B) induziert eine erhöhte Aufnahme in die Zellen, es kommt daher zur konzentrationsabhängigen Verschiebung der entsprechenden Fluoreszenzkurve (schwarz) nach rechts. Gezeigt ist ein Ergebnis aus n = 3 unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurde die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten β -Amyloid₁₋₄₀ in primäre mikrogliale Zellen genauer quantifiziert, indem die Flächen unter den Fluoreszenzkurven integriert wurden. Zudem wurden auch die Zellkulturüberstände der entsprechenden Zellen in einem Spektrophotometer mit Fluoreszenzkanal weiter untersucht. Durch die detektierte Fluoreszenz der Überstände, konnte auf den Gehalt an fluoreszenzmarkiertem β -Amyloid₁₋₄₀

zurückgeschlossen werden, welches nicht in die mikroglialen Zellen aufgenommen worden war.

Auf diesem Wege wurde überprüft, ob die gesteigerte Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ durch die Präinkubation mit CNI-1493 auch mit einer verminderten Konzentration des β -Amyloid₁₋₄₀ in den Überständen einhergeht. Konkordant zu der gesteigerten Aufnahme von β -Amyloid₁₋₄₀ in primäre mikrogliale Zellen (Abbildung 17A) ließ sich eine konzentrationsabhängige Verminderung von β -Amyloid₁₋₄₀ in den Überständen der Zellen nachweisen (Abbildung 17B).

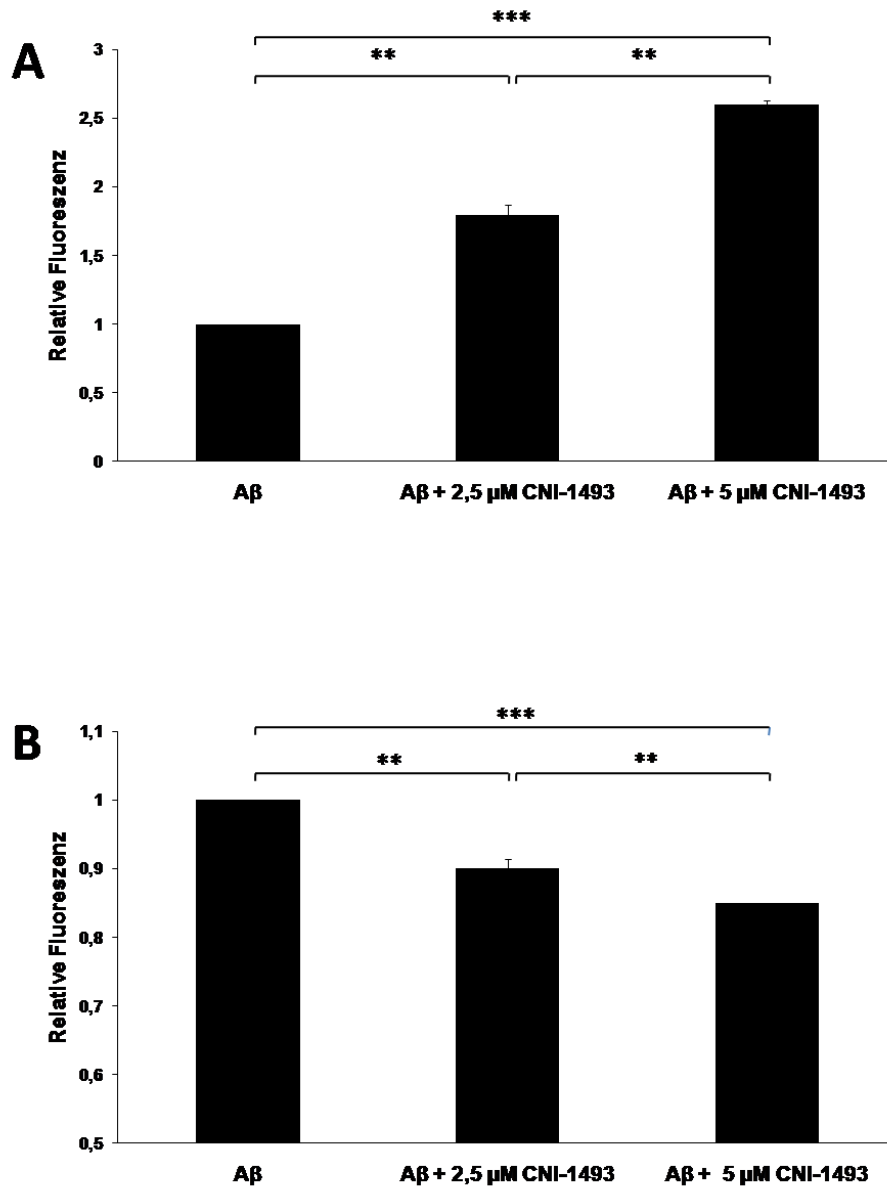


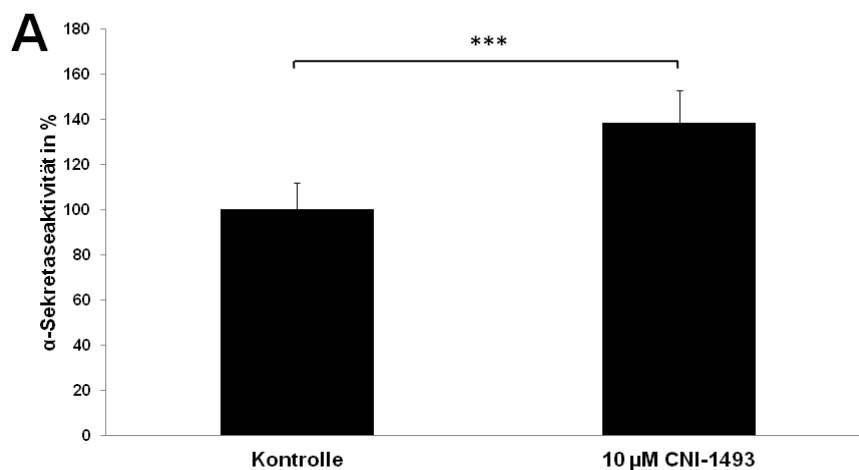
Abbildung 17: CNI-1493 reduziert β -Amyloid₁₋₄₀ in Zellkulturüberständen durch die erhöhte Aufnahme in mikrogliale Zellen. Die Präinkubation von primären mikroglialen Zellen mit CNI-1493 führt zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem β -Amyloid₁₋₄₀ in die Zellen (A), die in der Durchflusszytometrie bestimmt wurde. Die Messung der Fluoreszenz der entsprechenden Zellkulturüberstände erlaubt eine Aussage über den Anteil des markiertem β -Amyloid, welcher nicht in die Zellen aufgenommen wird. Durch die Präinkubation mit CNI-1493 lässt sich eine konzentrationsabhängige Reduktion des β -Amyloid Gehalts der Überstände feststellen (B). Die Anzahl der unabhängigen Experimente beträgt n = 3. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.6 Der Einfluss von CNI-1493 auf Sekretasen der APP-Prozessierung

Neben dem Einfluss auf β -Amyloid-induzierte Zytokine ist auch für antiinflammatorische Substanzen eine Wirkung auf Sekretasen der APP-Prozessierung beschrieben. Im nachfolgenden Teil der Arbeit wurde daher der Effekt von CNI-1493 auf die Sekretasen mikroglialer Zellen untersucht. Neben einer Untersuchung der Aktivität der Sekretasen wurde ein Westernblot der C-terminalen APP Spaltprodukte durchgeführt. In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob es durch die Wirkung von CNI-1493 auf Sekretasen auch zu einer Modulation der β -Amyloid-Sekretion durch mikrogliale Zellen kommt. Um der Frage nachzugehen, wie die Modulation der Sekretasenaktivität durch CNI-1493 in der Zelle vermittelt wird, wurde eine Real-TimePCR der mRNA verschiedener Enzyme durchgeführt, die α -Sekretasenaktivität besitzen. Auf diesem Wege wurde analysiert, ob CNI-1493 zu einer Induktion der α -Sekretase in Mikroglia führt.

3.6.1 CNI-1493 induziert die α -Sekretase

In einem *in vitro* Assay wurde die Aktivität der α -, β -, und γ - Sekretase in mikroglialen BV-2 Zellen nach Stimulation mit 10 μ M CNI-1493 für 24 h analysiert. Hierbei konnte eine Induktion der α -Sekretase festgestellt werden (Abbildung 18A). Die Aktivität der übrigen Sekretasen blieb durch die Inkubation mit CNI-1493 unbeeinflusst (Abbildung 18B +C).



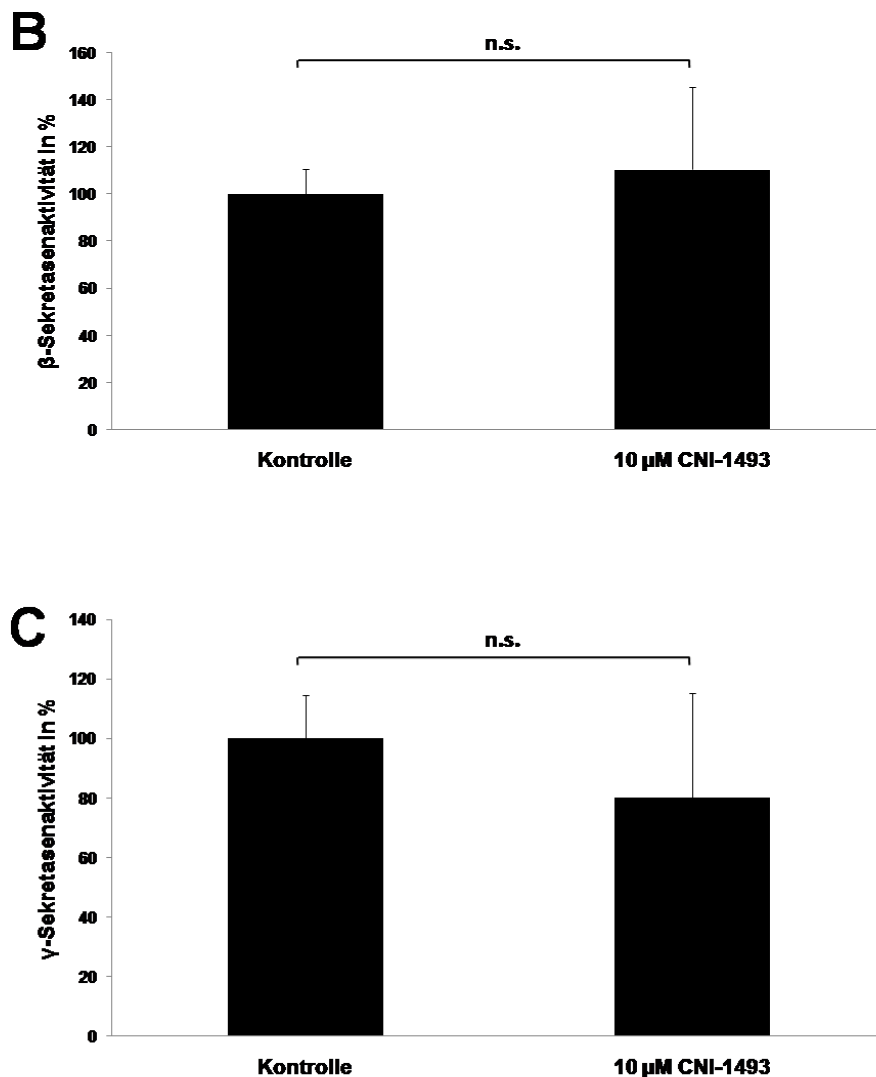


Abbildung 18: CNI-1493 induziert die Aktivität der α -Sekretase. Die Inkubation von mikroglialen BV-2 Zellen mit 10 μ M CNI-1493 induziert die Aktivität der α -Sekretase (A). Ein Einfluss auf die Aktivität der β - und γ -Sekretase (B + C) lässt sich hingegen nicht feststellen. Die Anzahl der unabhängigen Experimente beträgt n = 3. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.6.2 CNI-1493 induziert die Prozessierung des C83 Fragments in mikroglialen Zellen.

Um die beschriebene Aktivierung der α -Sekretase durch CNI-1493 weiter zu analysieren, wurde anschließend ein Westernblot der APP-Spaltprodukte durchgeführt, die durch die Einwirkung der Sekretase in der Zelle entstehen. Im Westernblot lässt sich sowohl für BV-2 Zellen (Abbildung 19A) als auch primäre Mikroglia (Abbildung 19B) ein dosisabhängiger

Anstieg des C-terminalen APP Fragments C83 erkennen. Bei der Zelllinie BV-2 kommt es zudem zu einer leichten Abnahme des APP-Gesamtproteins.

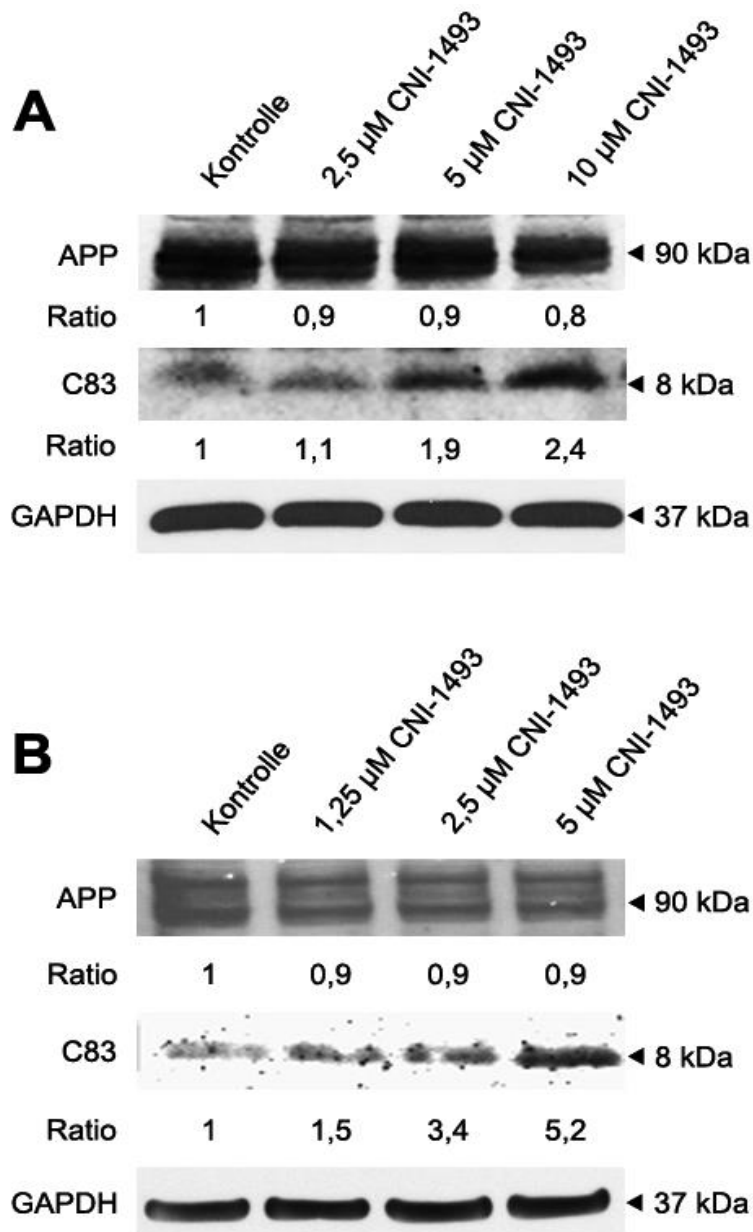


Abbildung 19: CNI-1493 induziert die Prozessierung von APP durch die α -Sekretase. Während die Gesamtmenge an APP durch die Wirkung von CNI-1493 kaum beeinflusst wurde, lässt sich sowohl bei BV-2 Zellen (A) als auch bei primären Zellen (B) ein konzentrationsabhängiger Anstieg des C83 Fragments detektieren. Um den Anstieg zu quantifizieren, wurden die Densitäten aus drei unabhängigen Versuchen bestimmt und der relative Anstieg als Ratio unterhalb der Blots wiedergegeben. GAPDH dient als Ladekontrolle, um eine konstant eingesetzte Proteinmenge zu garantieren. Gezeigt ist ein repräsentativer Blot aus n = 3 unabhängigen Versuchen.

3.6.3 CNI-1493 induziert ADAM 9 mRNA in mikroglialen BV-2 Zellen

Als Enzyme mit α -Sekretasenfunktion im Rahmen der APP-Prozessierung sind verschiedene Mitglieder der ADAM (A desintegrin and metalloproteinase) Familie beschrieben worden. Unter diesen nehmen ADAM-9 und ADAM-10 eine besondere Stellung ein (Deuss et al. 2008). Um der Fragestellung nachzugehen, wie CNI-1493 eine erhöhte α -Sekretasenaktivität in mikroglialen Zellen induziert, wurde in dieser Arbeit eine Real Time PCR (RT-PCR) von mikroglialen BV-2 Zellen 24 h nach Behandlung mit 10 μ M CNI-1493 durchgeführt. Dabei ließ sich für die mRNA von ADAM 9 eine signifikante Erhöhung durch die Inkubation der Zellen mit CNI-1493 feststellen (Abbildung 20A). Auch für ADAM 10 konnte ein Trend im Sinne einer Erhöhung durch CNI-1493 beobachtet werden (Abbildung 20B).

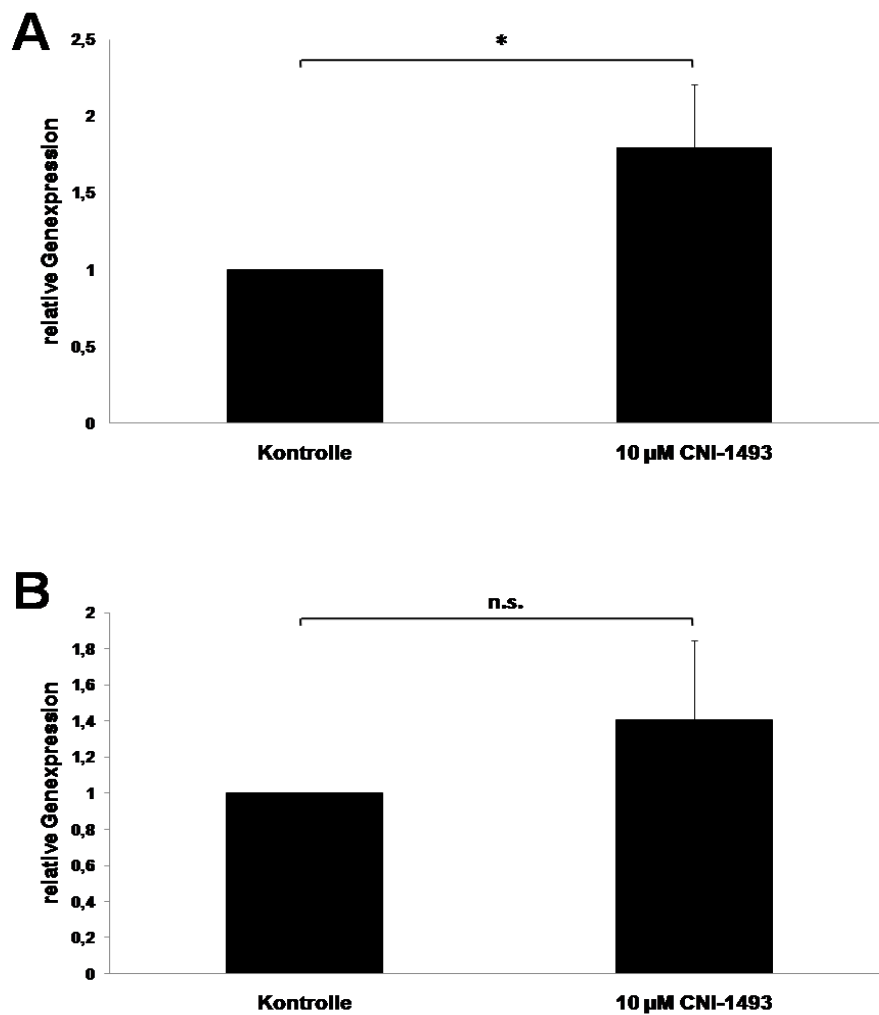


Abbildung 20: Einfluss von CNI-1493 auf die Bildung der mRNA von ADAM-9 und -10. Die Inkubation von BV-2 Zellen führt zur erhöhten Expression der ADAM-9 (A) und ADAM-10 (B) mRNA in mikroglialen BV-2 Zellen. Während der Anstieg für ADAM 9 statistisch signifikant ist, lässt sich für ADAM-10 lediglich ein Trend beobachten ($p > 0,05$). Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt $n = 3$. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.6.4 CNI-1493 vermindert die Sekretion von β -Amyloid₁₋₄₀ durch mikrogliale Zellen

Betrachtet man die dargestellten Ergebnisse in der Zusammenschau, so induziert CNI-1493 über eine erhöhte Expression von Enzymen der ADAM Familie in mikroglialen Zellen die α -Sekretase.

Um zu überprüfen, ob es in Folge einer gesteigerten α -Sekretasenaktivität zu einer verminderten Sekretion von β -Amyloid durch mikrogliale Zellen kommt, wurde ein β -Amyloid₁₋₄₀ ELISA der Überstände von mikroglialen BV-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit 10 μ M CNI-1493 durchgeführt. Hierbei ließ sich nach Behandlung mit CNI-1493 eine verminderte Sekretion von β -Amyloid durch Mikroglia beobachten (Abbildung 21).

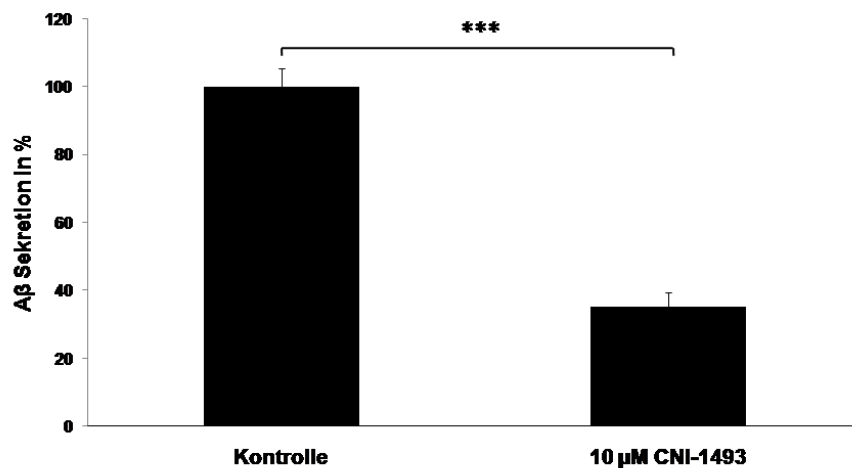


Abbildung 21: CNI-1493 reduziert die β -Amyloid₁₋₄₀ Sekretion mikroglialer BV-2 Zellen. Die Inkubation von mikroglialen Zellen mit 10 μ M CNI-1493 bewirkt eine Abnahme der β -Amyloid₁₋₄₀ Sekretion der Zellen, die durch einen ELISA der Zellkulturüberstände detektiert wurde. Die Anzahl der unabhängigen Versuche beträgt n = 3. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des p38-MAP Kinase Inhibitors CNI-1493 auf mikrogliale Zellen im Detail untersucht und weiter charakterisiert. Bacher et al. konnten bereits zeigen, dass CNI-1493 die Bildung von Amyloidplaques in den Gehirnen von APP überexprimierenden Mäusen verringern sowie deren kognitive Einbußen zu reduzieren vermag (Bacher et al. 2008). Mit der Untersuchung eines Oberflächenmarkers mikroglialer Zellen konnte die Arbeitsgruppe zudem einen ersten Hinweis auf den Einfluss von CNI-1493 auf die Aktivierung mikroglialer Zellen geben. Eine genauere Untersuchung der mikroglialen Aktivierung war jedoch nicht Bestandteil der vorangegangenen Arbeiten.

Wir konnten zeigen, dass β -Amyloid zum Zelltod von BV-2 Zellen sowie primären mikroglialen Zellen führt. Dieser Effekt war jedoch auf Oligomere des β -Amyloid Proteins beschränkt. Monomere waren nicht in der Lage schädigend auf die Zellen einzuwirken. Dieser Zusammenhang von Aggregation und toxischem Potential des β -Amyloid Proteins konnte bereits von zahlreichen Autoren für die β -Amyloid-induzierte Schädigung einer Reihe von Zellarten nachgewiesen werden (Luheshi et al. 2010). Während die β -Amyloid induzierte Apoptose von neuronalen Zellen vielfach untersucht und beschrieben wurde (Loo et al. 1993, Pike et al. 1993, Cotman et al. 1994), ist der Zelluntergang von Mikroglia ein Phänomen, dem bis vor einiger Zeit wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Nur wenige Arbeitsgruppen haben eine direkte Schädigung mikroglialer Zellen durch β -Amyloid nachweisen können (Jang et al. 2005, Davenport et al. 2010). Beachtet man die vielfältigen protektiven Funktionen, die mikrogliale Zellen im Sinne der Homöostaseerhaltung im Gehirn erfüllen, so ist eine Schädigung dieser Zellpopulation nicht ohne Relevanz. Im Rahmen der Demenz vom Alzheimertyp konnte gezeigt werden, dass Mikroglia einen wichtigen Beitrag zum Schutz neuronaler Zellen (Streit 2005) und für die Integrität der Synapsen untereinander (Tremblay et al. 2010) leisten. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass mikrogliale Zellen zur Phagozytose des neurotoxischen β -Amyloid fähig sind (Kawamata und Shimohama 2011). Darüber hinaus sind mikrogliale Zellen zur Sekretion protektiver Botenstoffe fähig (Bessis et al. 2007).

Während die klassische Hypothese zur Pathologie der Demenz vom Alzheimertyp mikroglialen Zellen vor allem eine schädigende Funktion gegenüber Neuronen im Sinne einer chronischen inflammatorischen Reaktion zuweist, wurde in den letzten Jahren von vielen

Autoren immer mehr die wichtige regulatorische Funktion der Zellen betont. Einige Autoren haben den Begriff der „microglia dysfunction hypothesis“ als Ursache der Demenz vom Alzheimer-Typ geprägt (Lopes et al. 2008, Streit et al. 2009). Grundlage dieser Theorie sind Beobachtungen hinsichtlich einer Schädigung mikroglialer Zellen, einerseits durch natürliche Alterungsprozesse, andererseits durch β -Amyloid Oligomere (Korotzer et al. 1993, Flanary et al. 2007). Die gestörte Funktion mikroglialer Zellen würde demzufolge der Schädigung neuronaler Zellen vorausgehen und der neuronale Untergang im Rahmen der Pathophysiologie der Erkrankung durch eine fehlende schützende Funktion mikroglialer Zellen zumindest mitbedingt sein. Bestätigung für diese Theorie ergaben Arbeiten, in denen sich auch in den Gehirnen verstorbener Alzheimer-Patienten zahlreiche dystrophe oder auch geschädigte mikrogliale Zellen nachweisen ließen, insbesondere in der Nähe neurofibrillärer Tangles. (Lopes et al. 2008). Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der amyotrophen Lateralsklerose, der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung oder dem M. Huntington konnten Hinweise für eine mikrogliale Degeneration gefunden werden (van Eitzen et al. 1998, Simmons et al. 2007, Fendrick et al. 2007). Der Schädigung mikroglialer Zellen scheint damit eine wichtige Rolle in der Pathologie der Demenz vom Alzheimer-Typ zuzukommen. Eine Reduktion der β -Amyloid-induzierten Schädigung könnte daher einen wichtigen Beitrag dazu leisten, modulierend auf den Verlauf der Erkrankung Einfluss zu nehmen.

Durch eine Inkubation von β -Amyloid₁₋₄₀ mit CNI-1493 konnte der Zelltod der BV-2 Zellen sowie der primären mikroglialen Zellen in der vorliegenden Arbeit wirkungsvoll reduziert werden. CNI-1493 bewahrt somit mikrogliale Zellen vor einer β -Amyloid-induzierten Degeneration, wie sie im Rahmen der Alzheimer-Pathologie zu beobachten ist. Dieser Wirkmechanismus könnte einen wichtigen Beitrag zu der bereits von Bacher et al. beschriebenen protektiven Funktion der Substanz in einem Mausmodell der Demenz vom Alzheimer-Typ leisten (Bacher et al. 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse war es wichtig, weiter zu untersuchen, ob es sich bei der beschriebenen Wirkung von CNI-1493 auf das Überleben mikroglialer Zellen um einen direkten Effekt auf die Zellen handelt, oder ob es zu einer Interaktion von CNI-1493 und β -Amyloid kommt. Dabei sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die Behandlung mit CNI-1493 auf β -Amyloid Oligomere ausübt. Eine Analyse der β -Amyloid Oligomere ergab, dass CNI-1493 das Oligomerisationsverhalten des Amyloidproteins beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass CNI-1493 in der Lage ist, die Entstehung von Oligomeren aus monomerem β -Amyloid₁₋₄₀ und β -Amyloid₁₋₄₂ zu unter-

binden. Bei der Inkubation von β -Amyloid mit CNI-1493 vor Beginn des beschriebenen Oligomerisationsprozesses konnte die Entstehung von oligomeren Strukturen bereits in niedrigen substöchiometrischen Konzentrationen von CNI-1493 wirkungsvoll unterbunden werden. Zusätzlich kam es durch die Wirkung von CNI-1493 in höheren Konzentrationen auch zur Bildung unlöslicher Amyloid-Aggregate, die dadurch präzipitierten. Diese Beobachtung erklärt die verringerte Menge von monomerem β -Amyloid in den durchgeführten Westernblots der Amyloid-Proben nach Inkubation mit höheren Konzentrationen von CNI-1493. Ein vergleichbarer Effekt ist bereits von Necula et al. für Nordihydroguajaretsäure beschrieben worden. Auch bei der Nordihydroguajaretsäure konnte sowohl eine Abnahme von oligomerem β -Amyloid als auch des Gesamt- β -Amyloids nach Koinkubation in der Darstellung im Westernblot Verfahren beobachtet werden. (Necula et al. 2007). Die Autoren erklärten dies entweder über das Verdecken von Bindungsstellen durch die Koinkubation von β -Amyloid mit der genannten Substanz, die durch den verwendeten monoklonalen Antikörper erkannt werden, oder durch die Bildung unlöslicher Präzipitate wie beispielsweise fibrilläres β -Amyloid (Necula et al. 2007).

Das toxische Agens der Erkrankung bilden jedoch die löslichen β -Amyloid-Oligomere und nicht die unlöslichen fibrillären Aggregationsformen (Westerman et al. 2002). Eine Verschiebung von Oligomeren hin zu unlöslichen fibrillären Strukturen könnte somit ein Weg zur Behandlung der Erkrankung sein (Hardy und Selkoe 2002, Glabe 2008, Necula et al. 2007).

In einem Tiermodell der Demenz vom Alzheimer-Typ konnten Caesar et al. diesen Wirkmechanismus bereits zeigen. Durch die Behandlung mit Curcumin ließ sich die Bildung von unlöslichen fibrillären β -Amyloid induzieren und somit die Neurotoxizität von oligomerem β -Amyloid unterbinden (Caesar et al. 2012).

Eine bisher nicht abschließend beantwortete Frage dabei ist, wie diese Modulatoren der Aggregation genau funktionieren. Möglich wäre einerseits eine beschleunigte Aggregation von oligomerem zu fibrillären β -Amyloids. Diese Theorie wird von Necula und Kollegen in Frage gestellt. Vielmehr postulieren die Autoren dieser Studie, dass Oligomerisation und Fibrillation möglicherweise zwei verschiedene Wege der Aggregation darstellen. So können einige Substanzen hinsichtlich der Aggregation ein Aggregationsinhibitor darstellen, andererseits aber Fibrillation induzieren und umgekehrt. Andere Substanzen wiederum können beide Wege blockieren. Auf welchem Wege nun CNI-1493 in die Aggregation eingreift, konnte durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden (Necula et al.

2007). Während in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von CNI-1493 in Aggregationsprozessen von monomeren β -Amyloid zu toxischen höheren Aggregationsformen untersucht wurde, konnten Bacher et al. auch eine Wirkung der Substanz auf bereits bestehende oligomere β -Amyloid Strukturen im Sinne einer Reduktion der Oligomere beschreiben (Bacher et al. 2008). CNI-1493 besitzt somit nicht nur die Fähigkeit in den Oligomerisationsprozess modulierend einzugreifen, sondern ist vielmehr auch in der Lage mit bereits bestehenden toxischen Oligomeren zu interagieren. Diese Fähigkeit ist nicht zuletzt für einen Einsatz in *in vivo* Studien bedeutsam, da in den gealterten Versuchstieren ein Großteil des β -Amyloid bereits in aggregierter Form vorliegt.

Im Unterschied zum Westernblot ließ sich im Dot-Blot-Verfahren keine Abnahme des Gesamt- β -Amyloids nach Inkubation mit CNI-1493 während des Oligomerisationsprozesses feststellen. Dies ist am ehesten methodentechnisch zu erklären. Im Westernblot können die angesprochenen höheren Aggregationsformen (Fibrillen bzw. Präzipitate) während der Gelelektrophorese in der Auftragungstasche zurückbleiben und dann auf dem Blot somit später nicht mehr sichtbar werden. Beim Dot-Blot-Verfahren hingegen wird die gesamte Proteinmenge auf ein Papier gegeben und eingetrocknet und bleibt damit später für die Antikörperdetektion sichtbar.

Die Reduktion der β -Amyloid-induzierten Toxizität in mikroglialen Zellen durch CNI-1493, die wir in der vorliegenden Arbeit nachweisen konnten, lässt sich sicherlich zu einem Großteil durch die Wirkung der Substanz auf die Oligomerisation des β -Amyloids zurückführen. Eine protektive Wirkung von CNI-1493 im Rahmen des β -Amyloid induzierten Zelltodes konnte auch bereits für die neuronale Zelllinie SHSY-5Y gezeigt werden (Bacher et al. 2008). Hier ist der Wirkmechanismus jedoch bisher nicht geklärt. Um der Frage weiter nachzugehen, inwieweit der zelltothemmende Effekt von CNI-1493 spezifisch der Wirkung auf Amyloid-Oligomere zuzurechnen ist, führten wir nachfolgend Experimente durch, in denen mikrogliale Zellen mithilfe des Apoptoseinduktors Staurosporin geschädigt wurden. Anschließend wurde überprüft, ob CNI-1493 auch in der Lage ist, diese Schädigung wirkungsvoll zu reduzieren. Staurosporin, das Gift des Bakteriums *Streptomyces staurosporeus*, stellt einen unspezifischen Proteinkinaseinhibitor, welcher zur Aktivierung des Caspase-abhängigen Zelltodes führt (Chae et al. 2000). Es ließ sich beobachten, dass CNI-1493 die Staurosporin-induzierte Apoptose mikroglialer Zellen in keiner Weise beeinflussen konnte. Insgesamt lässt sich somit folgern, dass CNI-1493 eine spezifische Wirkung auf das Oligomerisationsverhal-

ten von Amyloid- β auswirkt, wodurch die toxische Wirkung des Peptids auf die Mikroglia reduziert werden kann.

Zum Nachweis des Zelltodes verwendeten wir, wie im Material und Methodenteil dargestellt, MTT Assays. Dieser weist den Anteil lebender Zellen über die Reduktion eines Farbstoffes in den Mitochondrien nach. Damit lässt sich zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht differenzieren. In einer weiterführenden Studie sollte dieser Frage beispielsweise durch immunhistochemische Methoden weiter nachgegangen werden, um weiter abzuklären, welche Form von Zelltod in mikroglialen Zellen durch β -Amyloid bedingt wird.

In weiteren Studien wäre es von großem Interesse zu überprüfen, ob sich die Schädigung mikroglialer Zellen im Rahmen der Alzheimer-Pathologie, wie durch Streit et al. beschrieben, auch in Tiermodellen der Erkrankung abbilden lässt (Streit et al. 2009). In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, dass einige Autoren, die Relevanz residenter mikroglialer Zellen für die Alzheimer-Pathologie in Frage stellen. Vielmehr könnten im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen auch Makrophagen aus der Peripherie in das zentrale Nervensystem einwandern und sich zu Mikroglia-ähnlichen Zellen weiterentwickeln (Jucker und Heppner 2008, Prinz und Mildner 2011). Daher ist auch einer Untersuchung dieser Zellpopulationen hinsichtlich einer Schädigung durch Amyloid- β zu fordern, um zu klären, inwieweit auch diese Zellen eine Schädigung durch β -Amyloid-Oligomere erfahren. Nachfolgend könnte dann auch eine therapeutische Intervention mit CNI-1493 hinsichtlich seiner protektiven Wirkung auf monozytäre Zellen untersucht werden.

Neben dem Einfluss auf die β -Amyloid-induzierte Zellschädigung wurde auch untersucht, inwieweit CNI-1493 immunologische Eigenschaften mikroglialer Zellen moduliert. In diesem Zusammenhang wurden die Inflammation und die Phagozytose als bedeutende Aspekte der mikroglialen Funktion im Rahmen der Neuroinflammation der Demenz vom Alzheimer-Typ analysiert. Wie bereits weiter oben dargestellt (Vgl. Paragraph 1.6), induzieren β -Amyloid Oligomere und Fibrillen bei mikroglialen Zellen einen inflammatorischen Phänotyp, den sogenannten M1-Typ. Dieser ist durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und eine geringe Phagozytosefähigkeit gekennzeichnet. Der M1-Typ ist damit Bestandteil des neuroinflammatorischen Aspekts der Erkrankung, die einen bedeutenden Anteil zur Pathologie der Demenz vom Alzheimer-Typ beiträgt (Michelucci et al. 2009). Mit Hilfe des p38 MAPK-

Inhibitors CNI-1493 sollte überprüft werden, ob sich durch die Wirkung der Substanz bei mikroglialen Zellen ein protektiver Phänotyp induzieren lässt. Zunächst wurde das Zytokinprofil charakterisiert, das mikrogliale Zellen nach der Stimulation mit β -Amyloid sezernieren. Als Zytokine mit einer besonderen Bedeutung für die neuroinflammatorische Komponente der Demenz vom Alzheimer-Typ wurden TNF- α , IL-1 β und IL-6 beschrieben (Heneka und O'Banion 2007). Da sich in Vorversuchen auch nach einer Stimulation mit dem potenten Immunstimulanz LPS bei mikroglialen BV-2 Zellen keine Sekretion des Zytokins IL-1 β nachweisen ließ, wurden in der Zellkultur nur die Zytokine IL-6 und TNF- α untersucht.

Wir konnten zeigen, dass β -Amyloid Oligomere die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 in BV-2 Zellen sowie primären mikroglialen Zellen hervorrufen kann. Interessanterweise scheint neben dem IL-1 β diesen beiden Zytokinen eine bedeutende Rolle in der neuroinflammatorischen Kaskade im Rahmen der Alzheimer-Pathologie zuzukommen (Papassotiropoulos et al. 1999, Benzing et al. 1999, Munoz et al. 2007).

Zhao et al. konnten eine direkte Schädigung hippokampaler Neurone durch eine Behandlung mit TNF- α hervorrufen (Zhao et al. 2001). Ebenso konnte der Zusammenhang von erhöhten TNF- α Spiegeln und einer reduzierten synaptischen Plastizität beschrieben werden (Cunningham et al. 1996). Eine direkte Reduktion der TNF- α Spiegel im Gehirn von APP-überexprimierenden Mäusen konnte in einer Studie von Giuliani et al. die Entstehung kognitiver Defizite wirkungsvoll verhindern (Giuliani et al. 2009). Auch der Induktion von IL-6 wird eine bedeutende Rolle in der Entwicklung der Alzheimer-Pathologie zugesprochen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass IL-6 zur Hyperphosphorylierung von Tau und somit zur direkten Schädigung neuronaler Zellen führen kann (Quintanilla et al. 2004).

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass sich mithilfe der Koinkubation mit CNI-1493 die Induktion der angesprochenen Zytokine durch β -Amyloid erheblich vermindern ließ.

Um weiter zu untersuchen, wie sich die Regulation der Zytokinsekretion in Mikroglia erklären lässt, wurde die Aktivierung der p38 MAP Kinase untersucht. Es ist bekannt, dass die Induktion dieser MAP Kinase durch β -Amyloid die Sekretion wichtiger proinflammatorischer Zytokine zur Folge hat (Kim und Choi 2010). Wir konnten nachweisen, dass die Inkubation mit β -Amyloid₁₋₄₀ Oligomeren zu einer verstärkten Aktivierung des p38 MAP Kinase Weges führte. Durch die Koinkubation mit dem p38 MAPK Inhibitor CNI-1493 konnte sowohl die Induktion der p38 MAPK reduziert als auch die Zytokinsekretion wirkungsvoll vermindert

werden. Um auszuschließen, dass der Effekt von CNI-1493 lediglich auf der bereits zuvor beschriebenen destabilisierenden Wirkung auf β -Amyloid Oligomeren beruht, wurden zudem Experimente mit LPS angeschlossen. Es zeigte sich, dass CNI-1493 auch in der Lage ist, der LPS-induzierten Zytokinausschüttung entgegenzuwirken. Daraus kann geschlossen werden, dass CNI-1493 nicht nur mit den Oligomeren interagiert, sondern zusätzlich über eine Regulation der p38 MAPK die Sekretion proinflammatorischer Zytokine beeinflusst. Eine Reduktion der β -Amyloid-induzierten Zytokinsekretion ist auch bereits für den p38 MAPK Inhibitor SB 203580 beschrieben worden (Zhu et al. 2008).

In einem nächsten Schritt wurde die Phagozytose von β -Amyloid als zweitem wichtigen Aspekt der immunologischen Funktion mikroglialer Zellen analysiert. Die Phagozytose stellt einen wichtigen Beitrag mikroglialer Zellen dar, die β -Amyloid-Konzentration im Gehirn zu reduzieren. Wie bereits von Ard et al. beschrieben, sind mikrogliale Zellen in der Lage β -Amyloid aus Serum-freiem Medium aufzunehmen und in intrazelluläre Phagosomen zu überführen (Ard et al. 1996). Im Rahmen der Alzheimer-Pathologie kommt es zu einer eingeschränkten Fähigkeit mikroglialer Zellen β -Amyloid zu phagozytieren. Zhu et al. konnten zeigen, dass die Phagozytose mikroglialer Zellen durch den p38 MAPK Weg reguliert wird (Zhu et al. 2008). Die zunehmende Phosphorylierung des p38 Proteins durch die Inkubation mikroglialer Zellen mit β -Amyloid führte zur Beeinträchtigung der Phagozytose mikroglialer Zellen. Mit Hilfe eines p38 MAPK Inhibitors konnten die Autoren der genannten Studie die Phagozytosefähigkeit der mikroglialen Zellen verbessern (Zhu et al. 2008). Auch in dieser Studie konnten wir zeigen, dass β -Amyloid eine Induktion des p38 MAPK Weges bewirkt.

Gleichzeitig konnten wir sowohl in BV-2 Zellen als auch in primären mikroglialen Zellen lediglich eine geringe Aufnahme des Amyloid-Proteins nachweisen. Durch die Koinkubation mit dem p38 MAPK Inhibitor CNI-1493 ließ sich die Phagozytose von β -Amyloid₁₋₄₀ in beiden Zellarten dosisabhängig steigern. Zudem konnte auch eine Abnahme der β -Amyloid-Konzentration, die auf die Zellen gegeben wurde, gemessen werden. Auf welchem Wege β -Amyloid in die Zellen aufgenommen wird, war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Während man zunächst lediglich von einer Phagozytose als Mechanismus der Aufnahme ausging (Knauer et al. 1992, Koenigsknecht und Landreth 2004), konnten inzwischen auch andere Wege wie beispielsweise die Makropinozytose beschrieben werden (Mandrekar et al. 2009). Selbst wenn man sich zunächst auf den Mechanismus der Phagozytose beschränkt,

konnten eine Reihe verschiedener Rezeptoren beschrieben werden, über die die mikrogliale Phagozytose von β -Amyloid eingeleitet wird (Koenisgknecht und Landreth 2004).

In weiteren Arbeiten ist der Frage nachzugehen, welche Mechanismen durch den p38 MAPK inhibitor CNI-1493 moduliert werden, die eine Induktion der Aufnahme von β -Amyloid in mikrogliale Zellen bedingen.

Anhand der dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lässt sich schließen, dass mikrogliale Zellen unter dem Einfluss von CNI-1493 das Potential besitzen, β -Amyloid effektiv aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Doi et al. konnten nachweisen, dass die Aufnahme von β -Amyloid durch Mikroglia neuronale Zellen in einer gemischten Zellkultur vor der β -Amyloid-induzierten Apoptose schützen konnte (Doi et al. 2009). Ebenso könnte auch CNI-1493 über eine Aktivierung der Phagozytose neuroprotektiv wirken. Für eine weitere Untersuchung der Wirkung von CNI-1493 sind daher zukünftige Experimente in einer gemischten Zellkultur aus neuronalen und glialen Zellen anzustreben, um diese Effekte im Detail studieren zu können.

Betrachtet man die Wirkung von CNI-1493 auf β -Amyloid-stimulierte Mikroglia, lässt sich eine Modulation des Aktivierungsphänotyps der Zellen erkennen. Unter dem Einfluss des p38 MAPK Inhibitors sezernierten die untersuchten mikroglialen Zellen weniger proinflammatorische Zytokine als Reaktion auf die Inkubation mit β -Amyloid. Gleichzeitig konnte die Phagozytose der Zellen effektiv stimuliert werden. Betrachtet man die beiden in der Einleitung beschriebenen Aktivierungstypen, den M1 und M2 Typ, so kann ein Switch vom M1 hin zum M2 Typen durch die Behandlung mit CNI-1493 vermutet werden. Durch die Wirkung von CNI-1493 findet also nicht eine bloße Abschaltung mikroglialer Aktivierung statt. Vielmehr können schädlichen Eigenschaften aktivierter mikroglialer Zellen unter Beibehaltung der positiven Aspekte reduziert werden. Wie von Rogers et al. gefordert, könnte eine Behandlung mit CNI-1493 auf diesem Wege modulierend in inflammatorische Prozesse eingreifen, ohne gleichzeitig die protektiven Elemente der Entzündungsreaktion zu unterbinden (Rogers et al. 2002). In Tiermodellen der Demenz vom Alzheimer Typ ist die cerebrale Induktion proinflammatorischer Zytokine bereits ausführlich beschrieben (Abbas et al. 2002, Sly et al. 2001, Wu et al. 2010). In weiteren Untersuchungen sollte daher überprüft werden, ob CNI-1493 auch *in vivo* einen modulierenden Einfluss auf Aktivierungsvorgänge mikroglialer Zellen und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine auszuüben vermag. In einem Tierversuch könnte das Spektrum der zu untersuchenden Zytokine zudem

erheblich erweitert werden, was in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Zellkulturversuche bisher nicht gelang.

Von besonderem Interesse wäre die Untersuchung der Wirkung von CNI-1493 auf antiinflammatorische Zytokine, wie beispielsweise IL-10 oder IL-11. Bewirkt CNI-1493 auch hier eine bloße Reduktion der Ausschüttung des Zytokins, oder kommt CNI-1493 eine wirkliche immunmodulatorische Funktion zu? In diesem Fall wäre eine Induktion der entsprechenden antiinflammatorischen Zytokine zu erwarten. Diese Frage gewinnt auch dadurch an Relevanz, als dass inzwischen eine Reihe von Autoren auch klassischen proinflammatorischen Zytokinen wichtige Funktionen in der Homöostase neuronaler Netzwerke zusprechen. Saha et al. konnten belegen, dass TNF- α eine wichtige Rolle als protektiver Faktor gegenüber Zellstress bei Neuronen zukommt (Saha et al. 2009). Auch IL-6 scheint eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung und Entstehung synaptischer Plastizität wahrzunehmen (Balschun et al. 2004). Insgesamt kann gefolgert werden, dass für die neuroinflammatorische Komponente der Demenz vom Alzheimer-Typ nicht der bloße Anstieg einzelner Zytokine, sondern vielmehr eine Dysregulation pro- und antiinflammatorischer Mediatoren entscheidend ist (Ji et al. 2011).

Es besteht die Gefahr, die Zellkulturergebnisse der vorliegenden Arbeit überzubewerten, in der lediglich eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine gezeigt werden konnte. Ob CNI-1493 *in vivo* einer im Rahmen der Alzheimer-Pathologie entstandenen Verschiebung der Balance des Zusammenspiels pro- und antiinflammatorischer Zytokine hin zum proinflammatorischen Milieu effektiv entgegenzuwirken vermag, muss im Weiteren vielmehr erst noch evaluiert werden.

Schließlich wurde die Wirkung von CNI-1493 auf Sekretasen untersucht. Bacher et al. beobachteten in ihrer Studie eine Abnahme des löslichen β -Amyloid in den Gehirnen behandelter Mäuse nach der Gabe von CNI-1493 (Bacher et al. 2008). Neben dem beschriebenen gesteigerten Abbau durch mikrogliale Zellen könnte dies auch ein Hinweis auf eine reduzierte Synthese von β -Amyloid unter dem Einfluss von CNI-1493 darstellen. Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt durch eine verringerte β -Amyloid Sekretion durch Neuronen erklären lässt, untersuchten die Autoren der Studie den Einfluss von CNI-1493 auf Sekretasen der APP-Prozessierung in einer APP-transfizierten neuronalen Zelllinie. Hierbei ließ

sich keine Modulation der APP-Prozessierung feststellen. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass es sich bei der transfizierten neuronalen Zelle um ein artifizielles System handelt.

Neben neuronalen Zellen sind jedoch auch gliale Zellen an der Produktion von β -Amyloid im Gehirn beteiligt (Lin et al. 2009, Nord et al. 2010). Der Einfluss von CNI-1493 auf die Aktivität von Sekretasen in diesen Zellen wurde bisher noch nicht untersucht. Eine Wirkung von p38 MAP Kinase Inhibitoren auf Sekretasen wurde jedoch bereits von anderen Autoren beschrieben (Li et al., Bandyopadhyay et al. 2007). Für periphere Monozyten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition dieses Signalweges zu einer verringerten β -Amyloid Sekretion der Zellen führt (Sondag et al. 2009). Da in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass CNI-1493 eine Inhibition des p38 MAP Kinase Weges in Mikroglia bewirkt, wurde anschließend untersucht, ob sich durch diese Wirkung auch eine Reduktion der β -Amyloid Produktion in mikroglialen Zellen erreichen lässt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der p38 MAP Kinase Inhibitor CNI-1493 zu einer reduzierten Sekretion von β -Amyloid₁₋₄₀ in mikroglialen Zellen führt. Überdies ließ sich eine Aktivierung der α -Sekretase durch CNI-1493 beobachten. Um zu überprüfen, auf welchem Wege CNI-1493 diese Aktivierung induziert, wurden mithilfe von RT-PCR die Expression von Enzymen untersucht, die eine α -Sekretasenaktivität besitzen. Unter diesen spielen im Rahmen der APP-Prozessierung besonders ADAM-9 und -10 eine bedeutende Rolle (Deuss et al. 2008). Durch die Inkubation mikroglialer Zellen mit CNI-1493 konnte eine Induktion der mRNA von ADAM-9 nachgewiesen werden. Auch wenn in dieser Studie der Einfluss von CNI-1493 auf Enzyme mit α -Sekretasenaktivität bisher nur auf der RNA-Ebene dargestellt werden konnte, sprechen die Ergebnisse für eine Induktion der α -Sekretase in Mikroglia durch CNI-1493. Wir konnten zeigen, dass Mikroglia nach einer Therapie mit CNI-1493 weniger β -Amyloid sezernieren. Ein Erklärungsansatz für diese verminderte Sekretion von β -Amyloid ergibt sich dadurch die Induktion des nicht-amyloidogenen Weges der APP-Prozessierung durch die Behandlung mit CNI-1493. In Neuronen konnte gezeigt werden, dass eine Kompetition zwischen α - und β Sekretase um APP vorliegt. So reduziert eine erhöhte Aktivität einer der beiden Sekretasen die Möglichkeit der jeweils anderen APP zu prozessieren (Fahrenholz 2007). Während aber die β -Sekretase die Bildung des C99 Fragmentes aus APP bewirkt, welches der γ -Sekretase nachfolgend zur Freisetzung von β -Amyloid dient, schneidet die α -Sekretase innerhalb der β -Amyloid-Sequenz von APP und führt zur Bildung des nicht-amyloidogenen C83 (Postina et al. 2004). Dieser Theorie folgend führt eine Aktivierung der α -Sekre-

tase zu einer verminderten Produktion des APP-Fragmentes C99 und nachfolgend zu einer reduzierten Sekretion von β -Amyloid.

Ein dosisabhängiger Anstieg des α -Sekretasenprodukts C83 durch eine Behandlung mit CNI-1493 konnte in dieser Arbeit sowohl für die Zelllinie BV-2 als auch in primären Zellen nachgewiesen werden. Eine Darstellung des C99 Fragments gelang hingegen nicht, obwohl im ELISA die Sekretion von β -Amyloid beobachtet werden konnte. Mönning et al. dagegen konnten die Bildung des C99 Fragments aus APP in mikroglialen BV-2 Zellen nachweisen (Mönning et al. 1995). Allerdings führten die Autoren der Studie eine Immunpräzipitation zur Anreicherung des Peptides vor der Durchführung des Westernblots durch.

Neben der gesteigerten Phagozytose von β -Amyloid durch mikrogliale Zellen könnte somit auch eine reduzierte Prozessierung von APP zu β -Amyloid einen Erklärungsansatz für die Reduktion intracerebraler β -Amyloid Spiegel durch CNI-1493, wie beschrieben, darstellen (Bacher et al. 2008). Bei der Übertragung der Zellkulturexperimente auf die *in vivo* Situation im Gehirn des Mausmodells gilt es jedoch einige Faktoren zu beachten. Zum einen die Tatsache, dass mikrogliale Zellen mit 10 % eine vergleichsweise kleine Zellgruppe im Gehirn darstellen (Hanisch und Kettenmann 2007). Zum anderen konnten Haas et al. bereits zeigen, dass die Sekretion von β -Amyloid durch neuronale Zellen ungleich größer ist, als die Sekretionsaktivität monozytärer Zellen (Haas et al. 1991). In zukünftigen Studien mit Tiermodellen wird daher genau zu prüfen sein, wie groß die physiologische Relevanz der beschriebenen Effekte *in vivo* tatsächlich ist.

Bei der Bewertung der beschriebenen Ergebnisse gilt es darüber hinaus zu berücksichtigen, dass sich die Funktion der α -Sekretase nicht in APP-Prozessierung zu β -Amyloid, oder besser in der Inhibition der Sezernierung, erschöpft. Vielmehr könnte einer Modulation der α -Sekretasenaktivität monozytärer Zellen durch CNI-1493 eine Reihe weiterer Funktionen zukommen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Prozessierung von APP für eine Reihe immunologischer Prozesse Relevanz besitzt. Sodag et al. konnten zeigen, dass die Bindung monozytärer Zellen an die Proteine der extrazellulären Matrix mit einer erhöhten APP-Prozessierung einhergeht (Sodag und Combs 2010). Darüber hinaus spielt APP eine wichtige Rolle in der Differenzierung monozytärer Zellen zu Makrophagen (Bauer et al. 1991). Eine erhöhte Dichte von APP an der Zelloberfläche monozytärer Zellen im Gehirn lässt sich daher sowohl bei der Demenz in Zusammenhang mit HIV (Vehmas et al. 2004) als auch bei der Demenz vom Alzheimerstyp (Jung et al. 1999) beobachten. Weitere Untersuchungen sind

nötig, um zu überprüfen, inwieweit auch CNI-1493 auf diese Phänomene einzuwirken vermag.

Betrachtet man die Ergebnisse in der Zusammenschau, so wird deutlich, dass CNI-1493 zwei Hauptangriffspunkte aufweist. Zum einen wirkt die Substanz als p38-MAP Kinase Inhibitor auf einen wichtigen Signaltransduktionsweg, dessen Bedeutung für mehrere pathologische Prozesse im Rahmen der Demenz vom Alzheimerstyp gezeigt werden konnte (McDonald et al. 1998, Munoz und Ammit 2010). Hierüber lassen sich die in dieser Studie beschriebenen Effekte auf proinflammatorische Zytokine, die gesteigerte Phagozytose von β -Amyloid und die Induktion des nicht-amyloidogenen Weges der APP-Prozessierung in Mikroglia möglicherweise erklären. Andererseits konnte auch die Eigenschaft der Substanz beschrieben werden, mit β -Amyloid zu interferieren und dessen Oligomerisation zu hemmen. Auf diesem Wege ließ sich in der Zellkultur eine Reduktion der toxischen Wirkung der Oligomere auf mikrogliale Zellen bewirken.

CNI-1493 besitzt somit ein pleiotropes Wirkspektrum und setzt an vielen pathologischen Aspekten der Demenz vom Alzheimerstyp gleichzeitig an. Frautschy und Cole sehen gerade aufgrund der Komplexität der pathologischen Kaskaden der Erkrankung eine wichtige Bedeutung für Substanzen, die an mehreren Punkten wirken können (Frautschy und Cole 2010).

Die Limitationen dieser Arbeit liegen zuvorderst darin begründet, als dass alle Experimente bisher nur in Zellkulturmodellen durchgeführt wurden. Ransohoff und Perry verweisen darauf, wie wichtig die Mikroumgebung um die Mikroglia herum für deren Phänotyp ist (Ransohoff und Perry 2009). Bei der Gewinnung primärer mikroglialer Zellen, wie in der vorliegenden Arbeit, trennt man die Zellen aus dieser Umgebung heraus und schafft ein neues Medium. Dadurch kann es zu einer Aktivierung mikroglialer Zellen kommen. Die Zellen sind damit unter Umständen „voraktiviert“ und können sich in einigen Aspekten anders verhalten, als sie es in ihrer natürlichen Umgebung im Gehirn täten. Daher ist im Weiteren eine Reproduktion der Ergebnisse mithilfe von experimentellen Methoden zu fordern, die dem *in vivo* Zustand noch näher kommen können als die Zellkultur. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung von Gehirnschnitten (Boucsein et al. 2003, Hailer et al. 2005). Die beste Verifizierung der Ergebnisse könnte sicherlich *in vivo* im transgenen Tiermodell der Demenz vom Alzheimerstyp erreicht werden.

Einen weiteren Aspekt, dem in zukünftigen Studien vermehrte Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte, ist die von Njie et al. beschriebene Seneszenz des Phänotyps mikroglialer Zellen (Njie et al. 2012). Die Autoren dieser Studie konnten zeigen, dass mikrogliale Zellen, die aus älteren Tieren isoliert wurden, sich anders verhalten wie Mikroglia aus den Cortices jüngerer Tiere. Mikrogliale Zellen älterer Tiere reagierten mit einer viel stärker ausgeprägten inflammatorischen Reaktion auf die Stimulation mit Lipopolysacchariden. Zudem zeigten sie eine reduzierte Fähigkeit zur Aufnahme von β -Amyloid (Njie et al. 2012). Die primären mikroglialen Zellen dieser Arbeit dagegen wurden aus embryonalen Kortexen isoliert. In zukünftigen Arbeiten sollten daher die altersabhängigen Veränderungen mikroglialer Zellen mitberücksichtigt werden. Zumindest sollte einschränkend für alle Ergebnisse dieser Arbeit bedacht werden, dass die Eigenschaften und der Aktivierungsstatus mikroglialer Zellen beim gealterten Patienten mit Demenz vom Alzheimer-Typ unter Umständen vom Reaktionstyp der primären Zellen in dieser Arbeit abweichen kann.

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Studie relevante Wirkmechanismen von CNI-1493 in der mikroglialen Zellkultur aufklären. Unsere Daten zeigen, dass CNI-1493 sowohl einen direkten Effekt von CNI-1493 auf Oligomerisation von β -Amyloid im Sinne einer Inhibition der Bildung toxischer Aggregationsformen bewirkt als auch über eine Inhibition des p38 MAPK Signalweges immunologische Funktionen mikroglialer Zellen zu modulieren vermag. Über eine Aktivierung der α -Sekretase durch CNI-1493 ließ sich zudem eine Reduktion der β -Amyloid-Sekretion mikroglialer Zellen induzieren.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Wirkweise von Semapimod wäre es von großem Interesse eine Testung von CNI-1493 im Rahmen einer klinischen Studie beim Menschen durchzuführen. Nicht zuletzt, wenn man bedenkt, dass CNI-1493 bereits bei anderen Erkrankungen, wie dem M. Crohn, seine Sicherheit in der Anwendung beim Menschen unter Beweis gestellt hat (zumindest in Studien mit kurzer Behandlungsdauer) und bereits erfolgreich in einer klinischen Studie für die Behandlung der genannten Erkrankung getestet wurde (Dotan et al. 2010).

5.1 Zusammenfassung

Ein zentrales Merkmal der Demenz vom Alzheimertyp (AD) ist die Akkumulation von β -Amyloid-Oligomeren sowie die Ausbildung einer β -Amyloid-induzierten Entzündungsreaktion im Gehirn. β -Amyloid entsteht aus einem Vorläuferprotein, dem APP, welches durch Sekretasen prozessiert wird. Die Bildung und der Abbau dieser Oligomere stellen einen zentralen Ansatz in der Entwicklung neuer Medikamente für AD dar. Insbesondere wird versucht, die Sekretasenaktivität zu beeinflussen, den Abbau von β -Amyloid zu fördern, die Aggregation von β -Amyloid zu hemmen sowie die durch die Oligomere bedingte Toxizität zu beeinflussen. Darüber hinaus steht die Modulation der β -Amyloid-induzierten Inflammation, bei der es zu einer starken Aktivierung mikroglialer Zellen kommt, im Focus des Interesses.

In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der entzündungshemmende p38 MAPK Hemmstoff CNI-1493 in einem transgenen Mausmodell der Demenz vom Alzheimertyp zu einer deutlichen Reduktion der intrazerebralen β -Amyloid-Konzentration und gleichzeitig zu einer Verbesserung der Kognition dieser Tiere geführt hat. Allerdings sind die Wirkmechanismen dieser Substanz nicht vollständig geklärt. Auch die besondere Wirkung auf die Mikroglia, einer zentralen Zelle bei der Erkrankung, ist noch unklar. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zum einen die Interaktion zwischen CNI-1493 und β -Amyloid zu charakterisieren. Weiterhin wurde *in vitro* an primären Mikrogliazellen der Einfluss von CNI-1493 auf die Zytokinsekretion, die Aktivität der Sekretasen, die Toxizität von β -Amyloid und die Phagozytosefähigkeit untersucht.

Primäre Mikroglia wurden aus Mesokortizes von Mausembryonen isoliert. Zusätzlich erfolgten die ersten Experimente an einer Zellkulturlinie. Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden MTT-Assays durchgeführt. Die Sekretion von Zytokinen und Amyloid- β wurde mit Hilfe von ELISAs untersucht. Die Fähigkeit der Zellen zur Phagozytose wurde durch FACS-Analysen überprüft. Die Interaktion zwischen CNI-1493 und β -Amyloid-Oligomeren wurde anhand von Westernblot bzw. Dot-Blot-Verfahren getestet. Die Aktivität der Sekretasen wurde indirekt durch RT-PCR dargestellt, während deren Funktion mit Hilfe von fluorometrischen Assays bestimmt wurde.

Wir konnten zeigen, dass CNI-1493 in der Lage ist, die Bildung von toxischen Aggregationsformen des β -Amyloids zu hemmen. Dadurch ließ sich die β -Amyloid-induzierte Schädigung mikroglialer Zellen reduzieren. Auch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen

konnte durch CNI-1493 vermindert werden. Darüber hinaus ließ sich durch die Inkubation mit CNI-1493 die Phagozytose von β -Amyloid verbessern. Wir konnten auch zeigen, dass CNI-1493 die Funktion der α -Sekretase moduliert und dadurch die Induktion des nicht-amyloidogenen Weges der APP-Prozessierung induziert.

In der vorliegenden Studie konnten wir relevante Wirkmechanismen von CNI-1493 in der mikroglialen Zellkultur aufklären. Unsere Daten zeigen, dass es nicht nur zu einem direkten Effekt von CNI-1493 auf Bildung toxischer β -Amyloid-Oligomere kommt, sondern über eine Inhibition des p38 MAPK Signalweges auch zur Modulation immunologischer Funktionen von mikroglialen Zellen. Über eine Aktivierung der α -Sekretase durch CNI-1493 ließ sich zudem eine Reduktion der β -Amyloid-Sekretion mikroglialer Zellen induzieren. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse scheint diese Substanz gerade aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen für eine Therapie der AD geeignet. Berücksichtigt man die Tatsache, dass CNI-1493 bereits erfolgreich in einer klinischen Studie bei M. Crohn getestet wurde, wäre der Einsatz in einer klinischen Studie bei Patienten mit AD möglich.

5.2 Abstract

Introduction: Intracerebral accumulation of β -Amyloid oligomers and the induction of a β -Amyloid induced inflammatory response are crucial factors in the development of Alzheimer's disease. β -Amyloid peptides are generated from the amyloid precursor protein (APP) by a stepwise processing of the secretases. Generation as well as break-down of oligomeric β -Amyloid are key mechanisms for the development of drugs for Alzheimer's disease. Therapeutical targets are the modulation of secretase activity, induction of the degradation of β -Amyloid, inhibition of the aggregation of β -Amyloid as well as the reduction of β -Amyloid induced cell toxicity. Furthermore, attention is being paid to the modulation of β -Amyloid induced inflammatory mechanisms which are accompanied by the activation of microglial cells.

In this context, it has been shown that the anti-inflammatory p38 MAPK inhibitor CNI-1493 is able to inhibit the intracerebral accumulation of β -Amyloid as well as the cognitive deterioration in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Even though, the mechanism of action is far from being understood so far, current evidence points towards a regulatory effect on microglial activation. Therefore, a central aim of this study was to analyze the interaction of CNI-1493 and β -Amyloid. In addition, the influence of CNI-1493 on the secretion of cytokines, secretase activity, β -Amyloid toxicity and phagocytosis was investigated.

Primary microglial cells were isolated from embryonic mice cortices. Additionally, experiments were performed with a microglial cell line. Cell viability was assessed with MTT assays. We used ELISAs to analyze secretion of cytokines and β -Amyloid. Phagocytosis was investigated with FACS scans. Western-blot/ dot-blot techniques were used to show the interaction of CNI-1493 with β -Amyloid oligomers. RT-PCR was performed to analyze secretase expression, and secretase activity was determined using fluorimetric assays.

We were able to show an inhibition of the generation of toxic β -Amyloid oligomers by CNI-1493. As a result CNI-1493 is able to reduce β -Amyloid oligomer-induced toxicity in microglial cells. Additionally, CNI-1493 reduced the secretion of pro-inflammatory cytokines. Further phagocytosis of β -Amyloid was enhanced following incubation with CNI-1493. We could also show that CNI-1493 modulates α -secretase activity and hence induces the non-amyloidogenic pathway of APP processing.

In this study, we further characterized the important *in vitro* and *in vivo* mechanisms of action by CNI-1493. Our data show a direct effect of CNI-1493 on the generation of toxic β -Amyloid oligomers as well as a modulation of immunological functions of microglial cells by the inhibition of the p38 MAPK pathway. Induction of the α -secretase resulted in a reduced secretion of β -Amyloid by microglial cells. Given the various ways of actions, CNI-1493 seems to be an appropriate drug for the treatment of Alzheimer's disease. Since CNI-1493 has already been successfully used in chronic inflammatory diseases, it will be intriguing and informative to determine its effect in a clinical trial in patients suffering from Alzheimer's disease.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas N., Bednar I., Mix E., Marie S., Paterson D., Ljungberg A., Morris C., Winblad B., Nordberg A., Zhu J. (2002) Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *J Neuroimmunol* 126: 50-57.
- Adams R.A., Bauer J., Flick M.J., Sikorski S.L., Nuriel T., Lassmann H., Degen J.L., Akassoglou K. (2007) The fibrin-derived gamma377-395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 204: 571-582.
- Aguzzi A., O'Connor T. (2010) Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 9: 237-248.
- Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., Finch C.E., Frautschy S., Griffin W.S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie I.R., McGeer P.L., O'Banion M.K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strommeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F.L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T. (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 383-421.
- Alzheimer A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiat. Psych.-Gerichtl. Med.* 64: 146-148.
- Ard M.D., Cole G.M., Wei J., Mehrle A.P., Fratkin J.D. (1996) Scavenging of Alzheimer's amyloid beta-protein by microglia in culture. *J Neurosci Res* 43: 190-202.
- Bacher M., Dodel R., Aljabari B., Keyvani K., Marambaud P., Kaye R., Glabe C., Goertz N., Hoppmann A., Sachser N., Klotsche J., Schnell S., Lewejohann L., Al-Abed Y. (2008) CNI-1493 inhibits Abeta production, plaque formation, and cognitive deterioration in an animal model of Alzheimer's disease. *J Exp Med* 205: 1593-1599.
- Balschun D., Wetzel W., Del Rey A., Pitossi F., Schneider H., Zschratter W., Besedovsky H.O. (2004) Interleukin-6: a cytokine to forget. *Faseb J* 18: 1788-1790.
- Bandyopadhyay S., Goldstein L.E., Lahiri D.K., Rogers J.T. (2007) Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr Med Chem* 14: 2848-2864.
- Bauer J., König G., Strauss S., Jonas U., Ganter U., Weidemann A., Monning U., Masters C.L., Volk B., Berger M. (1991) In-vitro matured human macrophages express Alzheimer's beta A4-amyloid precursor protein indicating synthesis in microglial cells. *FEBS Lett* 282: 335-340.
- Benzing W.C., Wujek J.R., Ward E.K., Shaffer D., Ashe K.H., Younkin S.G., Brunden K.R. (1999) Evidence for glial-mediated inflammation in aged APP(SW) transgenic mice. *Neurobiol Aging* 20: 581-589.

- Bessis A., Bechade C., Bernard D., Roumier A. (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55: 233-238.
- Bhat N.R., Feinstein D.L., Shen Q., Bhat A.N. (2002) p38 MAPK-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa B, cAMP response element-binding protein, CCAAT/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* 277: 29584-29592.
- Bhat N.R., Zhang P., Lee J.C., Hogan E.L. (1998) Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 18: 1633-1641.
- Bianchi M., Bloom O., Raabe T., Cohen P.S., Chesney J., Sherry B., Schmidtayerova H., Calandra T., Zhang X., Bukrinsky M., Ulrich P., Cerami A., Tracey K.J. (1996) Suppression of proinflammatory cytokines in monocytes by a tetravalent guanyldiazide. *J Exp Med* 183: 927-936.
- Bianchi M., Ulrich P., Bloom O., Meistrell M., 3rd, Zimmerman G.A., Schmidtayerova H., Bukrinsky M., Donnelley T., Bucala R., Sherry B. (1995) An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med* 1: 254-266.
- Birks J. (2006) Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005593.
- Blasi E., Barluzzi R., Bocchini V., Mazzolla R., Bistoni F. (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J Neuroimmunol* 27: 229-237.
- Block M.L., Hong J.S. (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans* 35: 1127-1132.
- Bolmont T., Haiss F., Eicke D., Radde R., Mathis C.A., Klunk W.E., Kohsaka S., Jucker M., Calhoun M.E. (2008) Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci* 28: 4283-4292.
- Boucsein C., Zacharias R., Farber K., Pavlovic S., Hanisch U.K., Kettenmann H. (2003) Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* 17: 2267-2276.
- Braak H., Braak E. (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16: 271-278; discussion 278-284.
- Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. (2007) Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 3: 186-191.
- Burnette W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203.

- Caesar I., Jonson M., Nilsson K.P., Thor S., Hammarstrom P. (2012) Curcumin promotes A-beta fibrillation and reduces neurotoxicity in transgenic *Drosophila*. *PLoS One* 7: e31424.
- Chae H.J., Kang J.S., Byun J.O., Han K.S., Kim D.U., Oh S.M., Kim H.M., Chae S.W., Kim H.R. (2000) Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* 42: 373-381.
- Chang Z., Luo Y., Zhang Y., Wei G. (2011) Interactions of Abeta25-35 beta-barrel-like oligomers with anionic lipid bilayer and resulting membrane leakage: an all-atom molecular dynamics study. *J Phys Chem B* 115: 1165-1174.
- Choy E.H., Panayi G.S. (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344: 907-916.
- Churcher I. (2006) Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem* 6: 579-595.
- Cipriani G., Dolciotti C., Picchi L., Bonuccelli U. (2010) Alzheimer and his disease: a brief history. *Neurol Sci* 32: 275-279.
- Cohen P.S., Nakshatri H., Dennis J., Caragine T., Bianchi M., Cerami A., Tracey K.J. (1996) CNI-1493 inhibits monocyte/macrophage tumor necrosis factor by suppression of translation efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3967-3971.
- Combs C.K. (2009) Inflammation and microglia actions in Alzheimer's disease. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 380-388.
- Combs C.K., Karlo J.C., Kao S.C., Landreth G.E. (2001) beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21: 1179-1188.
- Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3: 207-212.
- Cotman C.W., Whittemore E.R., Watt J.A., Anderson A.J., Loo D.T. (1994) Possible role of apoptosis in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 747: 36-49.
- Cuenda A., Rousseau S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773: 1358-1375.
- Cunningham A.J., Murray C.A., O'Neill L.A., Lynch M.A., O'Connor J.J. (1996) Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett* 203: 17-20.
- Cunningham C. (2012) Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* 61: 71-90.
- Davalos D., Grutzendler J., Yang G., Kim J.V., Zuo Y., Jung S., Littman D.R., Dustin M.L., Gan W.B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8: 752-758.

- Davenport C.M., Sevastou I.G., Hooper C., Pocock J.M. (2010) Inhibiting p53 pathways in microglia attenuates microglial-evoked neurotoxicity following exposure to Alzheimer peptides. *J Neurochem* 112: 552-563.
- de Haas A.H., Boddeke H.W., Biber K. (2008) Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia* 56: 888-894.
- Deuss M., Reiss K., Hartmann D. (2008) Part-time alpha-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17. *Curr Alzheimer Res* 5: 187-201.
- Doi Y., Mizuno T., Maki Y., Jin S., Mizoguchi H., Ikeyama M., Doi M., Michikawa M., Takeuchi H., Suzumura A. (2009) Microglia activated with the toll-like receptor 9 ligand CpG attenuate oligomeric amyloid {beta} neurotoxicity in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 175: 2121-2132.
- Dotan I., Rachmilewitz D., Schreiber S., Eliakim R., van der Woude C.J., Kornbluth A., Buchman A.L., Bar-Meir S., Bokemeyer B., Goldin E., Maaser C., Mahadevan U., Seidler U., Hoffman J.C., Homoky D., Plasse T., Powers B., Rutgeerts P., Hommes D. (2010) A randomised placebo-controlled multicentre trial of intravenous semapimod HCl for moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 59: 760-766.
- Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Cummings J.L., Dekosky S.T., Barberger-Gateau P., Delacourte A., Frisoni G., Fox N.C., Galasko D., Gauthier S., Hampel H., Jicha G.A., Meguro K., O'Brien J., Pasquier F., Robert P., Rossor M., Salloway S., Sarazin M., de Souza L.C., Stern Y., Visser P.J., Scheltens P. (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9: 1118-1127.
- Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Dekosky S.T., Barberger-Gateau P., Cummings J., Delacourte A., Galasko D., Gauthier S., Jicha G., Meguro K., O'Brien J., Pasquier F., Robert P., Rossor M., Salloway S., Stern Y., Visser P.J., Scheltens P. (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 6: 734-746.
- Duyckaerts C., Potier M.C., Delatour B. (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115: 5-38.
- Eikelenboom P., Veerhuis R., Exel E.V., Hoozemans J.J., Rozemuller A.J., van Gool W.A. (2011) The Early Involvement of the Innate Immunity in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Neuropathological, Epidemiological and Genetic Evidence. *Curr Alzheimer Res* 8: 142-150.
- Eisele Y.S., Baumann M., Klebl B., Nordhammer C., Jucker M., Kilger E. (2007) Gleevec increases levels of the amyloid precursor protein intracellular domain and of the amyloid-beta degrading enzyme neprilysin. *Mol Biol Cell* 18: 3591-3600.
- Fahrenholz F. (2007) Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res* 4: 412-417.
- Fendrick S.E., Xue Q.S., Streit W.J. (2007) Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *J Neuroinflammation* 4: 9.

- Flanary B.E., Sammons N.W., Nguyen C., Walker D., Streit W.J. (2007) Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res* 10: 61-74.
- Fourgeaud L., Boulanger L.M. (2007) Synapse remodeling, compliments of the complement system. *Cell* 131: 1034-1036.
- Frautschy S.A., Cole G.M. (2010) Why pleiotropic interventions are needed for Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 41: 392-409.
- Giuffrida M.L., Caraci F., De Bona P., Pappalardo G., Nicoletti F., Rizzarelli E., Copani A. (2010) The monomer state of beta-amyloid: where the Alzheimer's disease protein meets physiology. *Rev Neurosci* 21: 83-93.
- Giuliani F., Vernay A., Leuba G., Schenk F. (2009) Decreased behavioral impairments in an Alzheimer mice model by interfering with TNF-alpha metabolism. *Brain Res Bull* 80: 302-308.
- Glabe C.G. (2008) Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem* 283: 29639-29643.
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704-706.
- Gomes-Leal W. (2012) Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav* 2: 345-356.
- Griffiths M., Neal J.W., Gasque P. (2007) Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* 82: 29-55.
- Haass C., Hung A.Y., Selkoe D.J. (1991) Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci* 11: 3783-3793.
- Haass C., Selkoe D.J. (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75: 1039-1042.
- Haass C., Selkoe D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 101-112.
- Hailer N.P., Vogt C., Korf H.W., Dehghani F. (2005) Interleukin-1beta exacerbates and interleukin-1 receptor antagonist attenuates neuronal injury and microglial activation after excitotoxic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci* 21: 2347-2360.
- Hanisch U.K., Kettenmann H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10: 1387-1394.
- Hardy J., Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353-356.

- Hardy J.A., Higgins G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-185.
- Hattori M., Osterfield M., Flanagan J.G. (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289: 1360-1365.
- Hayashi S., Sato N., Yamamoto A., Ikegame Y., Nakashima S., Ogihara T., Morishita R. (2009) Alzheimer disease-associated peptide, amyloid beta40, inhibits vascular regeneration with induction of endothelial autophagy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 1909-1915.
- Heneka M.T., O'Banion M.K. (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184: 69-91.
- Heneka M.T., O'Banion M.K., Terwel D., Kummer M.P. (2010) Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 117: 919-947.
- Herrmann N., Li A., Lanctot K. (2011) Memantine in dementia: a review of the current evidence. *Expert Opin Pharmacother* 12: 787-800.
- Hommes D.W., Erkelens W., Ponsioen C., Stokkers P., Rauws E., van der Spek M., ten Kate F., van Deventer S.J. (2008) A double-blind, placebo-controlled, randomized study of infliximab in primary sclerosing cholangitis. *J Clin Gastroenterol* 42: 522-526.
- Hung A.Y., Haass C., Nitsch R.M., Qiu W.Q., Citron M., Wurtman R.J., Growdon J.H., Selkoe D.J. (1993) Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein. *J Biol Chem* 268: 22959-22962.
- Hunt A.E., Lali F.V., Lord J.D., Nelson B.H., Miyazaki T., Tracey K.J., Foxwell B.M. (1999) Role of interleukin (IL)-2 receptor beta-chain subdomains and Shc in p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p54 MAP kinase (stress-activated protein Kinase/c-Jun N-terminal kinase) activation. IL-2-driven proliferation is independent of p38 and p54 MAP kinase activation. *J Biol Chem* 274: 7591-7597.
- Imbimbo B.P., Giardina G.A. (2011) gamma-Secretase Inhibitors and Modulators for the Treatment of Alzheimer's Disease: Disappointments and Hopes. *Curr Top Med Chem*.
- Jana M., Palencia C.A., Pahan K. (2008) Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol* 181: 7254-7262.
- Jang M.H., Jung S.B., Lee M.H., Kim C.J., Oh Y.T., Kang I., Kim J., Kim E.H. (2005) Melatonin attenuates amyloid beta25-35-induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. *Neurosci Lett* 380: 26-31.
- Ji C., Song C., Zuo P. (2011) The Mechanism of Memory Impairment Induced by Abeta Chronic Administration Involves Imbalance Between Cytokines and Neurotrophins in the Rat Hippocampus. *Curr Alzheimer Res* 8: 410-420.

- Jimenez S., Baglietto-Vargas D., Caballero C., Moreno-Gonzalez I., Torres M., Sanchez-Varo R., Ruano D., Vizuete M., Gutierrez A., Vitorica J. (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* 28: 11650-11661.
- Johnson-Wood K., Lee M., Motter R., Hu K., Gordon G., Barbour R., Khan K., Gordon M., Tan H., Games D., Lieberburg I., Schenk D., Seubert P., McConlogue L. (1997) Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1550-1555.
- Jucker M., Heppner F.L. (2008) Cerebral and peripheral amyloid phagocytes--an old liaison with a new twist. *Neuron* 59: 8-10.
- Jung S.S., Gauthier S., Cashman N.R. (1999) Beta-amyloid precursor protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 20: 249-257.
- Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Muller-Hill B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733-736.
- Kaushal V., Schlichter L.C. (2008) Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *J Neurosci* 28: 2221-2230.
- Kawamata J., Shimohama S. (2011) Stimulating nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J Alzheimers Dis* 24: 95-109.
- Kayed R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300: 486-489.
- Kim E.K., Choi E.J. (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802: 396-405.
- Kim S.H., Terry M.E., Hoops P., Dauwalder M., Roux S.J. (1988) Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiol* 88: 1446-1453.
- Knauer M.F., Soreghan B., Burdick D., Kosmoski J., Glabe C.G. (1992) Intracellular accumulation and resistance to degradation of the Alzheimer amyloid A4/beta protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7437-7441.
- Koenigsknecht J., Landreth G. (2004) Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci* 24: 9838-9846.
- Kojro E., Fahrenholz F. (2005) The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* 38: 105-127.
- Korotzer A.R., Pike C.J., Cotman C.W. (1993) beta-Amyloid peptides induce degeneration of cultured rat microglia. *Brain Res* 624: 121-125.

- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lawson L.J., Perry V.H., Dri P., Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39: 151-170.
- Lee V.M., Balin B.J., Otvos L., Jr., Trojanowski J.Q. (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science* 251: 675-678.
- LeVine H., 3rd (2007) Small molecule inhibitors of Abeta assembly. *Amyloid* 14: 185-197.
- Li Q., Wu D., Zhang L., Zhang Y. (2010) Effects of galantamine on beta-amyloid release and beta-site cleaving enzyme 1 expression in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Exp Gerontol* 45: 842-847.
- Lin H.C., Hsieh H.M., Chen Y.H., Hu M.L. (2009) S-Adenosylhomocysteine increases beta-amyloid formation in BV-2 microglial cells by increased expressions of beta-amyloid precursor protein and presenilin 1 and by hypomethylation of these gene promoters. *Neurotoxicology* 30: 622-627.
- Loo D.T., Copani A., Pike C.J., Whittemore E.R., Walencewicz A.J., Cotman C.W. (1993) Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7951-7955.
- Lopes K.O., Sparks D.L., Streit W.J. (2008) Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia* 56: 1048-1060.
- Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E., Brachova L., Shen Y., Sue L., Beach T., Kurth J.H., Rydel R.E., Rogers J. (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155: 853-862.
- Luheshi L.M., Hoyer W., de Barros T.P., van Dijk Hard I., Brorsson A.C., Macao B., Persson C., Crowther D.C., Lomas D.A., Stahl S., Dobson C.M., Hard T. (2010) Sequestration of the Abeta peptide prevents toxicity and promotes degradation in vivo. *PLoS Biol* 8: e1000334.
- Malchiodi-Albedi F., Paradisi S., Matteucci A., Frank C., Diociaiuti M. (2011) Amyloid oligomer neurotoxicity, calcium dysregulation, and lipid rafts. *Int J Alzheimers Dis* 1802: 406-415.
- Mandrekar S., Jiang Q., Lee C.Y., Koenigsknecht-Talboo J., Holtzman D.M., Landreth G.E. (2009) Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci* 29: 4252-4262.
- Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-461.
- Masliah E., Terry R. (1993) The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system. *Brain Pathol* 3: 77-85.
- Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4245-4249.

- Maurer K., Volk S., Gerbaldo H. (1997) Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349: 1546-1549.
- McDonald D.R., Bamberger M.E., Combs C.K., Landreth G.E. (1998) beta-Amyloid fibrils activate parallel mitogen-activated protein kinase pathways in microglia and THP1 monocytes. *J Neurosci* 18: 4451-4460.
- McKercher S.R., Torbett B.E., Anderson K.L., Henkel G.W., Vestal D.J., Baribault H., Klemsz M., Feeney A.J., Wu G.E., Paige C.J., Maki R.A. (1996) Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *Embo J* 15: 5647-5658.
- Mesterton J., Wimo A., By A., Langworth S., Winblad B., Jonsson L. (2010) Cross sectional observational study on the societal costs of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 7: 358-367.
- Michelucci A., Heurtaux T., Grandbarbe L., Morga E., Heuschling P. (2009) Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 210: 3-12.
- Monning U., Sandbrink R., Weidemann A., Banati R.B., Masters C.L., Beyreuther K. (1995) Extracellular matrix influences the biogenesis of amyloid precursor protein in microglial cells. *J Biol Chem* 270: 7104-7110.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Mosser D.M., Edwards J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
- Mullan M., Crawford F., Axelman K., Houlden H., Lilius L., Winblad B., Lannfelt L. (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1: 345-347.
- Müllner M. (2005) Erfolgreich wissenschaftlich arbeiten in der Klinik - evidence based medicine. Springer Wien New York: S. 173ff.
- Munoz L., Ammit A.J. (2010) Targeting p38 MAPK pathway for the treatment of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 58: 561-568.
- Munoz L., Ralay Ranaivo H., Roy S.M., Hu W., Craft J.M., McNamara L.K., Chico L.W., Van Eldik L.J., Watterson D.M. (2007) A novel p38 alpha MAPK inhibitor suppresses brain proinflammatory cytokine up-regulation and attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neuroinflammation* 4: 21.
- Necula M., Kaye R., Milton S., Glabe C.G. (2007) Small molecule inhibitors of aggregation indicate that amyloid beta oligomerization and fibrillization pathways are independent and distinct. *J Biol Chem* 282: 10311-10324.
- Nimmerjahn F., Bruhns P., Horiuchi K., Ravetch J.V. (2005) FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 23: 41-51.

- Njie E.G., Boelen E., Stassen F.R., Steinbusch H.W., Borchelt D.R., Streit W.J. (2012) Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging* 33: 195 e191-112.
- Nord L.C., Sundqvist J., Andersson E., Fried G. (2010) Analysis of oestrogen regulation of alpha-, beta- and gamma-secretase gene and protein expression in cultured human neuronal and glial cells. *Neurodegener Dis* 7: 349-364.
- Oke S.L., Tracey K.J. (2008) From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex. *J Leukoc Biol* 83: 512-517.
- Origlia N., Righi M., Capsoni S., Cattaneo A., Fang F., Stern D.M., Chen J.X., Schmidt A.M., Arancio O., Yan S.D., Domenici L. (2008) Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. *J Neurosci* 28: 3521-3530.
- Papassotiropoulos A., Bagli M., Jessen F., Bayer T.A., Maier W., Rao M.L., Heun R. (1999) A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45: 666-668.
- Perl D.P. (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77: 32-42.
- Persidsky Y., Ramirez S.H., Haorah J., Kanmogne G.D. (2006) Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 1: 223-236.
- Pike C.J., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687.
- Postina R., Schroeder A., Dewachter I., Bohl J., Schmitt U., Kojro E., Prinzen C., Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenue A., Godaux E., van Leuven F., Fahrenholz F. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113: 1456-1464.
- Prinz M., Mildner A. (2011) Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia* 59: 177-187.
- Prinzen C., Trumbach D., Wurst W., Endres K., Postina R., Fahrenholz F. (2009) Differential gene expression in ADAM10 and mutant ADAM10 transgenic mice. *BMC Genomics* 10: 66.
- Quintanilla R.A., Orellana D.I., Gonzalez-Billault C., Maccioni R.B. (2004) Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 295: 245-257.
- Raivich G. (2005) Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci* 28: 571-573.
- Ransohoff R.M., Perry V.H. (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27: 119-145.

- Rice D.P., Fillit H.M., Max W., Knopman D.S., Lloyd J.R., Duttagupta S. (2001) Prevalence, costs, and treatment of Alzheimer's disease and related dementia: a managed care perspective. *Am J Manag Care* 7: 809-818.
- Ring S., Weyer S.W., Kilian S.B., Waldron E., Pietrzik C.U., Filippov M.A., Herms J., Buchholz C., Eckman C.B., Korte M., Wolfer D.P., Muller U.C. (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27: 7817-7826.
- Rogers J., Strohmeier R., Kovelowski C.J., Li R. (2002) Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* 40: 260-269.
- Rojo L.E., Fernandez J.A., Maccioni A.A., Jimenez J.M., Maccioni R.B. (2008) Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 39: 1-16.
- Roth L. (2010) Alternative Mezhoden für Nukleinsäure basierten Nachweis genetisch veränderter Lebens- und Futtermittel. S. 19ff.
- Saha R.N., Ghosh A., Palencia C.A., Fung Y.K., Dudek S.M., Pahan K. (2009) TNF-alpha preconditioning protects neurons via neuron-specific up-regulation of CREB-binding protein. *J Immunol* 183: 2068-2078.
- Sastre M., Klockgether T., Heneka M.T. (2006) Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 24: 167-176.
- Sastre M., Steiner H., Fuchs K., Capell A., Multhaup G., Condrón M.M., Teplow D.B., Haass C. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2: 835-841.
- Saura J., Tusell J.M., Serratos J. (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44: 183-189.
- Schieven G.L. (2005) The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* 5: 921-928.
- Schindler J.F., Monahan J.B., Smith W.G. (2007) p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J Dent Res* 86: 800-811.
- Schwartz M., Shechter R. (2010) Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6: 405-410.
- Selkoe D.J. (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192: 106-113.
- Simmons D.A., Casale M., Alcon B., Pham N., Narayan N., Lynch G. (2007) Ferritin accumulation in dystrophic microglia is an early event in the development of Huntington's disease. *Glia* 55: 1074-1084.

- Sly L.M., Krzesicki R.F., Brashler J.R., Buhl A.E., McKinley D.D., Carter D.B., Chin J.E. (2001) Endogenous brain cytokine mRNA and inflammatory responses to lipopolysaccharide are elevated in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 56: 581-588.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Sondag C.M., Combs C.K. (2010) Adhesion of monocytes to type I collagen stimulates an APP-dependent proinflammatory signaling response and release of Abeta1-40. *J Neuroinflammation* 7: 22.
- Sondag C.M., Dhawan G., Combs C.K. (2009) Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J Neuroinflammation* 6: 1.
- Stevens B., Allen N.J., Vazquez L.E., Howell G.R., Christopherson K.S., Nouri N., Micheva K.D., Mehalow A.K., Huberman A.D., Stafford B., Sher A., Litke A.M., Lambris J.D., Smith S.J., John S.W., Barres B.A. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164-1178.
- Stokes D.G., Kremer J.M. (2003) Potential of tumor necrosis factor neutralization strategies in rheumatologic disorders other than rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 33: 1-18.
- Stoll G., Jander S. (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58: 233-247.
- Stoscheck (1990) Quantitation of Protein. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 182, pp. 50-69.
- Streit W.J. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139.
- Streit W.J. (2005) Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 234-239.
- Streit W.J., Braak H., Xue Q.S., Bechmann I. (2009) Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118: 475-485.
- Suh G.H., Ryu S.H., Lee D.W., Han C., Ju Y.S., Kee B.S., Lee J.N., Bae J.N., Choi J.H., Kim D.J., Lee N.J., Lee J.Y., Go H.J., Yi J.S., Cho S.J., Jeon Y.W. (2011) Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer Disease: Do They Provide More Than Symptomatic Benefits? *Am J Geriatr Psychiatry* 19: 266-273.
- Tancredi V., D'Antuono M., Cafe C., Giovedi S., Bue M.C., D'Arcangelo G., Onofri F., Benfenati F. (2000) The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* 75: 634-643.

- Taylor D.L., Diemel L.T., Pocock J.M. (2003) Activation of microglial group III metabotropic glutamate receptors protects neurons against microglial neurotoxicity. *J Neurosci* 23: 2150-2160.
- Tremblay M.E., Lowery R.L., Majewska A.K. (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8: e1000527.
- Tremblay M.E., Stevens B., Sierra A., Wake H., Bessis A., Nimmerjahn A. (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31: 16064-16069.
- Ulloa L. (2005) The vagus nerve and the nicotinic anti-inflammatory pathway. *Nat Rev Drug Discov* 4: 673-684.
- van Eitzen U., Egensperger R., Kosel S., Grasbon-Frodl E.M., Imai Y., Bise K., Kohsaka S., Mehraein P., Graeber M.B. (1998) Microglia and the development of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 246-256.
- van Goor H., Melenhorst W.B., Turner A.J., Holgate S.T. (2009) Adamalysins in biology and disease. *J Pathol* 219: 277-286.
- Vehmas A., Lieu J., Pardo C.A., McArthur J.C., Gartner S. (2004) Amyloid precursor protein expression in circulating monocytes and brain macrophages from patients with HIV-associated cognitive impairment. *J Neuroimmunol* 157: 99-110.
- Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Rowan M.J., Selkoe D.J. (2002) Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem Soc Trans* 30: 552-557.
- Westerman M.A., Cooper-Blacketer D., Mariash A., Kotilinek L., Kawarabayashi T., Younkin L.H., Carlson G.A., Younkin S.G., Ashe K.H. (2002) The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22: 1858-1867.
- Wimo A., Prince M. (2010) The World Alzheimer Report 2010: the global economic impact of dementia. . Alzheimer's Disease International (ADI).
- Wisniewski H.M., Vorbrodt A.W., Moretz R.C., Lossinsky A.S., Grundke-Iqbal I. (1982) Pathogenesis of neuritic (senile) and amyloid plaque formation. *Exp Brain Res Suppl* 5: 3-9.
- Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T., Selkoe D.J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398: 513-517.
- Wu X., Lu Y., Dong Y., Zhang G., Zhang Y., Xu Z., Culley D.J., Crosby G., Marcantonio E.R., Tanzi R.E., Xie Z. (2010) The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-1beta. *Neurobiol Aging* 33: 1364-1378.
- Zhao X., Bausano B., Pike B.R., Newcomb-Fernandez J.K., Wang K.K., Shohami E., Ringger N.C., DeFord S.M., Anderson D.K., Hayes R.L. (2001) TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures. *J Neurosci Res* 64: 121-131.

Zhu Y., Hou H., Nikolic W.V., Ehrhart J., Rrapo E., Bickford P., Giunta B., Tan J. (2008) CD45RB is a novel molecular therapeutic target to inhibit Abeta peptide-induced microglial MAPK activation. PLoS One 3: e2135.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid
AD	Alzheimer's Disease
ADAM	A desintegrin and metalloproteinase
AICD	APP intracellular domain
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APP	Amyloid precursor protein
APS	Ammoniumpersulfat
BACE	β -site APP cleaving enzyme 1
BCA	Bicinchoninsäure
Bicin	N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-glycin
Bis-Tris	Bis (2-hydroxyethyl) amino-tris (hydroxymethyl) methan
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C83/CTF α	C-terminal fragment α
C99/CTF β	C-terminal fragment β
ca.	circa
DABCL	ϵ -(4-dimethylamino-phenylazobenzoyl)-L-lysin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDANS	5-((2-aminoethyl)amino) naphthalen-1-sulfonsäure
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	Familiäre Demenz vom Alzheimerstyp

ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
engl.	Englisch
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
G	Gauge
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulationsfaktor
h	Stunde
HFIP	Hexafluorisopropanol
HRP	Horseradish peroxide
ICD	International Classification of Diseases
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L 15	Leibovitz 15 (Medium)
LDS	Litiumdodecylsulfat
mRNA	Messenger ribonucleic acid
M	Molar
mA	Milliampère
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
NF κ B	Nuclear factor of activated B-cells
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MES	2-(N-morpholino) Ethansulfonsäure
Milli Q	Destilliertes Wasser
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

MTT	(3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid)
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
nM	Nanomol
O.D.	Optische Dichte
NP-40	Nonylphenoethoxylat-40
p3	Protein 3
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEI	Polyethylenimin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PCR	Polymerase chain reaction
PBS	Phosphate buffered saline
P38 MAPK	p38 mitogenactivated protein kinase
RIPA	Radio immune precipitation assay
RIP	Regulierte intramembranöse Proteolyse
RNA	Ribonucleic acid
RPM	Umdrehungen pro Minute
sAPP α	Soluble APP α
sAPP β	Soluble APP β
SDS	Sodium dodecylsulfate
sog.	sogenannt
t	Time
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	transforming growth factor β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris-(hydroxyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen / min
V	Volt
Vgl.	Vergleiche

ZNS Zentrales Nervensystem

7.2 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Originalarbeiten

Bach JP*, **Mengel D***, Wahle T, Kautz A, Balzer-Geldsetzer M, Al-Abed Y, Dodel R, Bacher M (2011) The role of CNI-1493 in the function of primary microglia with respect to β -Amyloid. *J Alzheimers Dis*, **26**, 69-80.

Mengel D*, Röskam S*, Neff F, Gold M, Nölker C, Bacher M, Dodel R, Bach JP (2012) Rapid effect on cognition by naturally occurring autoantibodies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*, **3**:e236

Weitere Publikationen

Gold M, **Mengel D**, Röskam S, Dodel R, Bach J (2012) Mechanism of action of nAbs-A β with respect to amyloid beta, neuroinflammation and phagocytosis. *J Neuroinflammation*, **10**:5

*geteilte Erstautorenschaft

7.4 Liste der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller	Hofmann	Neubauer
Bals	Hoyer	Oertel
Barth	Höffken	Pagenstecher
Bartsch	Kann	Renz
Basler	Klose	Rosenow
Becker	Knake	Rothmund
Bartsch	Kohlmann	Ruchholtz
Bauer	Köhler	Schmidt
Behr	König	Schneider
Bien	Krieg	Sekundo
Daut	Langer	Simon
Dodel	Lill	Sommer
Engelhardt-Cabilic	Lohoff	Steiniger
Feuser	Maier, R.F.	Sure
Görg	Maier, T.	Vogelmeier
Gress	Maisch	Wagner, H.-J.
Grimm	Moll	Wagner, U.
Hamer	Möller	Weihe
Hertl	Mueller	Werner

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dodel der mir eine sehr umfassende Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten vermittelt hat. Er war immer bereit, Fragen zu beantworten und Ideen zu diskutieren. Darüber hinaus ermöglichte er mir es auch mit zahlreichen internationalen Wissenschaftlern in Kontakt zu treten und mit ihnen zu kooperieren.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Bach für seine zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und seine umfassende Hilfestellung bei vielen experimentellen Fragestellungen bedanken. Über das wissenschaftliche Arbeiten hinaus hat er mir auch einen umfassenden Einblick in die klinische Neurologie gegeben und meine Begeisterung für dieses spannende Fach bestärkt. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Bacher möchte ich für viele spannende wissenschaftliche Anregungen und Ideen meinen Dank aussprechen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei MTA Beata Januscheck dafür bedanken, dass sie häufig spontan eingesprungen ist, wenn Experimente weitergeführt werden mussten, ich aber gleichzeitig Pflichttermine an der Universität absolvieren musste.

Dr. Tina Wahle-Schuldt möchte ich für die bereichernde Kooperation bei der Untersuchung der Sekretasen und APP-Spaltprodukte danken.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern und Geschwistern, die mich auf diesem nicht immer einfachen Weg begleitet und mich in schwierigen Phasen immer wieder motiviert haben.

Zum Schluss danke ich Frau Lisa Preiß. Sie war nicht nur eine große Hilfe bei der Korrektur der Arbeit, sondern darüber hinaus hat sie meine bisherigen wissenschaftlichen Tätigkeiten immer mit viel Humor und Verständnis unterstützt.